

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



A Depressão Consanguínea na Adaptação ao Cativeiro

**Análise de *Fitness*, Características Comportamentais e da
História da Vida em *Drosophila subobscura***

Marta Alexandra Arandas dos Santos

Mestrado em Biologia Evolutiva e do Desenvolvimento

2008

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



A Depressão Consanguínea na Adaptação ao Cativoiro

**Análise de *Fitness*, Características Comportamentais e da
História da Vida em *Drosophila subobscura***

Marta Alexandra Arandas dos Santos

Dissertação orientada por:

Professora Doutora Margarida Maria Demyon de Carneiro Pacheco de Matos

Mestrado em Biologia Evolutiva e do Desenvolvimento

2008

Aos meus Príncipes: Maria, Manuel e João Pedro,
a próxima geração...

Pieces of heaven...

Small pieces of days of long ago, or coming just around the corner, seconds, minutes, hours, days, months or years, today, tomorrow, yesterday, the change, the constancy, a smile, the sound of rain falling in the window, a hug, a friend holding us tight, someone making a funny joke just to make us laugh, falling in love, the joy of a 4-year-cousin, an afternoon spent playing the guitar, having someone teaching a new music, a 5-month-old cat, a 1-year-old cat or dog, a giant green turtle, an afternoon in the zoo, missing someone because you like him/her, wanting to go somewhere, family, reading, staying at home, growing up, being a child, seeing series with a sister, talking with someone you like, seeing photographs, friends, going to the cinema, music... so many, so different...

Pieces of heaven...

memories of yesterday,
dreams of tomorrow,
the present...

Just keep on living...

give them opportunity to knock your breath out with the dazzling beauty of this stupid-happy-confusing-loving-broken-new-old-white-black-gray-constant-always-changing world...

Just keep on moving...

just keep on living...

Inês Fragata

Agradecimentos

“This is the end, my only friend, the end...” (The Doors)

Termina (finalmente!) agora e aqui mais uma etapa. A jornada não foi longa, mas foi muito, muito dura... Os dias sucederam-se vigorosos e doridos, os percalços não se pouparam a esforços e irromperam em catadupa, deixando atrás de si apenas cansaço, sobretudo cansaço (*“Supremíssimo [...] íssimo, íssimo cansaço!”*). É quase interminável a lista de pessoas que estoicamente me acompanharam nesta viagem e merecem o mais sincero agradecimento; não conseguiria exprimi-lo convenientemente, nem mesmo com todos os adjectivos do meu léxico.

Começo com a Professora Margarida Matos, a *Grande-Chefa-Que-Tudo-Sabe*, por ter acreditado em mim desde o início, pela doçura com que sempre me tratou, pela paciência infindável com que lidou com os meus (tão frequentes) pseudo-dramas, por me ter dado a mão quando a Terra tremeu e por me ter feito acreditar que, efectivamente, *“Nothing in Biology makes sense except in the light of evolution.”*

À Josiane Santos agradeço a loucura e o sorriso mágico com que me presenteou todos os dias, a tolerância com que respondeu à imensidão de perguntas com que a bombardeei, o melhor salame de chocolate do Universo e por me mostrar que, às vezes, um bocadinho de calma e ponderação podem fazer-me muito mais feliz.

Ao Pedro Simões quero agradecer o ascendente pedagógico, a prontidão com que sempre enveredou comigo em todas aquelas discussões (às vezes tão inúteis!), a gargalhada fácil e contagiante e, por fim, ter-me azucrinado o juízo todos os dias! (Vou ter tantas saudades tuas! Muita força e muito boa sorte em Barcelona!)

À Carla Rego e ao Mário Boieiro, o casal mais encantador do Mundo, por me terem sorrido tantas vezes e ajudado a construir um relacionamento tão sólido com a *Drosophila*!

Ao Carlos T., por ter estado sempre presente, por todo o paternalismo e amizade com que candidamente me tratou ao longo destes anos, por todos os ajuizados conselhos, pelos cafés em que me acompanhou e por partilhar comigo o deslumbrante mundo das Tartarugas.

Ao Joca, meu eterno mestre, por tudo! Por nunca me ter deixado cair ou algum dia ter duvidado que eu era o supprassumo da pastilha. Por me ensinar que o Sol nasce todas as manhãs apenas para me acordar, por me ter feito perder tantas vezes em delírios de interpretação e tão docemente me ter protegido e acompanhado, *just like a rainbow...*

Ao Professor Eduardo Crespo agradeço as divertidas palestras com que me deliciou, a Teoria da Pangénese Amebóide, as tortuosas descrições de *Eléments d'Embryologie* e todos os cognomes fantásticos que me atribuiu (desde pinguim a lagartixa, passando por mexerica, beringela e beldroega!).

À Ana Santos, a minha P.A. loira, agradeço a amizade inabalável, a força e o apoio. Por ter estado presente naqueles meses tão delicados, por me ter ajudado a superar o momento mais difícil da minha vida, por ter ficado comigo quando já quase todos tinham ido embora.

Ao Lobo F., por ter surgido na minha vida e me ter amado incondicionalmente desde então. Por me ter feito perder e ajudado a encontrar, por me fazer acreditar que eu podia ser “*alguém, de novo*”! Por todos os sonhos, pela Beatriz e pelas as lágrimas que bebemos juntos...

Ao T., pelo sorriso rasgado que fez valer a pena tantos dias enevoados e pela doçura dos seus olhos enormes (pintados de azul, raiados de verde-esmeralda e cinza) que continuam a deslumbrar-me todos os dias. Por tantas vezes me ter envolvido num abraço fechado e me ter feito sonhar no mais confortável de todos os colos. Por ter pincelado a minha vida de cor, por me ter feito duvidar (agora e sempre) e por me ter mostrado que há preços demasiado elevados que não merecem ser pagos.

À AEFCL que me proporcionou os melhores anos da minha vida e os melhores amigos que poderia desejar: Leitão (o Porquinho mais lindo do Mundo!), Español, Xana, Paulinha, Carlitos, Vanessa, Cláudia, Joana e Filipe, os dois Andrés e todos os demais... À VicenTuna, por me ter enchido o coração com as mais belas baladas e me ter mostrado o verdadeiro significado do espírito académico.

Às mulheres da minha vida, que têm em comum o facto de se chamarem Inês, agradeço tudo! A amizade com que me presentearam a cada momento, o apoio incondicional, o abraço fechado e nunca me terem deixado sentir só... À Inês Castro, por ser o mais sólido pilar da minha existência, por me amar todos os dias com uma força inabalável, por um dia me ter levado a andar de baloiço e me fazer acreditar que o Mundo é todo meu! À Inês Fragata (minha peste!), por me dar o melhor “*Bom dia!*” de todos, por tantas horas que penámos no laboratório, pelos filmes da treta e os gelados que partilhámos, por me fazer sentir pequenina e acreditar que um dia vou ser grande.

Ao meu velho Pai, o meu maior ídolo, que há muitos anos teve de aceitar amar-me à distância, por toda a força que me transmitiu, por todas as palavras doces e duras que proferiu, por me fazer envergar (com tanto orgulho!) o nome que trajo. Por me ter dado a Paula, a Nelsa, a Andreia e, por fim, o Manelinho (os melhores irmãos do Mundo!).

A toda a família Tomé, por me ter recebido com tanto carinho. Em especial, ao Joe, o meu segundo pai, agradeço profundamente ter-me amado e mimado como se fosse sua filha. Por sempre ter acreditado em mim e apoiado incondicionalmente, por amar a minha Mãe todos os dias e fazê-la tão feliz.

À minha Mãe, a Mulher mais importante da minha vida, agradeço o Mundo! Por ter estado sempre presente, por me ter amado tanto, por me ter acompanhado firme e estóica em todos os momentos. Por nunca me ter deixado desistir e me fazer sentir o seu maior orgulho. Pelo mau-feitio que me transmitiu e a força inabalável do seu coração!

Aos meus Príncipes (fundadores da próxima geração), a quem dedico esta dissertação, por serem a razão que me faz acreditar que vale a pena!

Resumo

A domesticação é uma das temáticas mais clássicas da Biologia Evolutiva, podendo ser encarada como a mais antiga experiência evolutiva imposta pelo Homem. A compreensão do processo adaptativo de populações naturais ao cativeiro é fundamental, não só em estudos de evolução em geral, mas também na problemática da conservação. Particularmente, em planos de conservação *ex-situ*, as alterações evolutivas durante a adaptação a ambientes cativos, assim como a perda de variabilidade genética e a depressão consanguínea, poderão dificultar a reintrodução das populações nos seus ambientes naturais. Espera-se que o tamanho populacional afecte de modo oposto os processos selectivos e de deriva genética; todavia, mais estudos são necessários sobre o efeito deste factor na dinâmica evolutiva no cativeiro. Com esta dissertação pretendeu ampliar-se a análise de trajectórias evolutivas realizada pelo Grupo de Evolução Experimental (CBA-FCUL), alargando estes estudos a populações com diferentes efectivos e tempos de permanência em laboratório e abordando outras características, como a *fitness* reprodutiva e o comportamento de acasalamento. Este trabalho surgiu numa tentativa de integrar diferentes processos genéticos e evolutivos subjacentes à adaptação ao cativeiro, nomeadamente, a selecção, a consanguinidade e as suas interacções. Espera-se, assim, poder contribuir para a melhor compreensão dos processos e padrões evolutivos decorrentes da adaptação ao cativeiro. Os resultados apresentados nesta dissertação vêm corroborar os obtidos anteriormente: as populações com maior tempo de permanência neste ambiente mostraram uma tendência geral para melhor desempenho em várias características da história da vida, maior *fitness* e menor taxa evolutiva do que as populações mais recentemente introduzidas. Sugerem, também, uma maior heterogeneidade interpopulacional na dinâmica evolutiva, uma diminuição no desempenho das populações de efectivo reduzido nas características associadas à *fitness* (como a fecundidade e o comportamento de acasalamento) e um abrandamento na dinâmica adaptativa.

Palavras-chave: adaptação, conservação, *Drosophila subobscura*, consanguinidade, *fitness*, comportamento, cativeiro, evolução experimental

Abstract

Domestication is one of the most important topics in Evolutionary Biology and may be considered the most ancient evolutionary experiment made by humans. Understanding the adaptive process of natural populations to captivity is essential not only in general evolutionary studies, but also in conservation programmes. In particular, in *ex-situ* conservation programmes, the evolutionary changes throughout adaptation to captivity may seriously compromise the success of reintroduction of populations to the wild. Population size is expected to affect in opposite directions the selection response and genetic drift, but more studies are needed to characterize the relevance of this factor on the evolutionary dynamics during captivity. The aim of this thesis was to expand the characterization of evolutionary trajectories made by the Group of Experimental Evolution (CBA-FCUL), extending these studies to populations of different size and time of establishment in the laboratory. We also intend to study other characters such as fitness and mating behaviour. These studies come as an attempt to integrate different evolutionary and genetic processes underlying evolutionary dynamics during captivity, such as selection, inbreeding and their interaction. With such a focus we hope to contribute to a better understanding of the processes and patterns underlying adaptation to captivity. The results presented here corroborate those obtained in the past: the populations earlier introduced in the laboratory environment showed a general trend to better performance in several life-history traits, better fitness and smaller evolutionary rate than the populations later introduced. They also suggest a higher heterogeneity between populations, a decrease in the performance of small-size populations in characters close to fitness (such as fecundity and mating behaviour) and a slowing down of adaptive dynamics.

Keywords: adaptation, conservation, *Drosophila subobscura*, inbreeding, fitness, behaviour, captivity, experimental evolution

Índice

Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract	ix
Índice	xi
Lista de Figuras	xiii
Lista de Tabelas	xv
Introdução Geral	1
Capítulo 1 – Características da História da Vida	
1.1 – Introdução	9
1.2 – Materiais e Métodos	13
1.3 – Resultados	18
1.4 – Discussão	27
Capítulo 2 – <i>Fitness</i> e Híbridos de Populações-Réplica	
1.1 – Introdução	31
1.2 – Materiais e Métodos	33
1.3 – Resultados	37
1.4 – Discussão	42
Capítulo 3 – Comportamento de Acasalamento	
1.1 – Introdução	45
1.2 – Materiais e Métodos	48
1.3 – Resultados	52
1.4 – Discussão	58
Considerações Finais	61
Bibliografia	63

Lista de Figuras

1 – Mapa arqueológico das primeiras culturas neolíticas e sua dispersão.	2
2 – Ciclo de vida da <i>Drosophila</i> .	2
3 – As extinções em massa.	4
4 – Relações esperadas entre a <i>fitness</i> e o efectivo populacional devidas a depressão consanguínea, acumulação de mutações e adaptação genética ao cativeiro.	6
1.1.1 – Perda de diversidade genética ao longo das gerações em populações com diferentes efectivos (N_e).	10
1.3.1 – Valores médios da idade da primeira reprodução.	19
1.3.2 – Valores médios da fecundidade precoce.	20
1.3.3 – Valores médios da fecundidade de pico.	20
1.3.4 – Valores médios da resistência à inanição de machos.	21
1.3.5 – Valores médios da resistência à inanição de fêmeas.	21
1.3.6 – Trajectórias evolutivas para a idade da primeira reprodução.	23
1.3.7 – Trajectórias evolutivas para a fecundidade precoce.	24
1.3.8 – Trajectórias evolutivas para a fecundidade de pico.	24
1.3.9 – Trajectórias evolutivas para a resistência à inanição de machos.	25
1.3.10 – Trajectórias evolutivas para a resistência à inanição de fêmeas.	26
2.3.1 – Valores médios do número de machos descendentes.	38
2.3.2 – Valores médios do número de fêmeas descendentes.	38
2.3.3 – Valores médios do número total de descendentes.	39
2.3.4 – Trajectórias evolutivas para o número total de descendentes.	40
2.3.5 – Valores médios do número total de descendentes das populações parentais e híbridas.	41
3.3.1 – Valores médios dos parâmetros do comportamento de acasalamento.	53
3.3.2 – Valores médios do sucesso de acasalamento para os quatro regimes em estudo.	56
3.3.3 – Distribuição teórica do sucesso de acasalamento para os regimes <i>short-term</i> .	56
3.3.3 – Distribuição teórica do sucesso de acasalamento para os regimes <i>long-term</i> .	57

Lista de Tabelas

1.2.1 – Ensaio de características da história da vida: tempo de permanência em laboratório e em regime de efectivo reduzido (<i>small-size</i>).	15
1.3.1 – Valores de p da ANOVA TRIFACTORIAL MISTA aplicada a cada um dos ensaios (G6, G10 e G14) para cada uma das características estudadas.	18
1.3.2 – Valores de p da ANOVA TETRACTORIAL MISTA aplicada às cinco características estudadas.	19
1.3.3 – Valores de p da ANCOVA aplicada às cinco características estudadas.	19
1.3.4 – Razão entre os valores observados de resposta à selecção, para cada característica da história da vida.	23
2.2.1 – Ensaio de <i>fitness</i> : tempo de permanência em laboratório e em regime de efectivo reduzido (<i>small-size</i>).	34
2.2.2 – Ensaio de <i>fitness</i> híbridos de populações-réplica: tempo de permanência em laboratório e em regime de efectivo reduzido (<i>small-size</i>).	34
2.3.1 – Valores de p da ANOVA BIFACTORIAL aplicada a cada um dos ensaios (G5, G9 e G13) para cada uma das variáveis.	37
2.3.2 – Valores de p da ANOVA TRIFACTORIAL aplicada às três características estudadas.	37
2.3.3 – Valores de p da ANCOVA aplicada às três características estudadas.	37
3.2.1 – Ensaio de comportamento de acasalamento: tempo de permanência em laboratório e em regime de efectivo reduzido (<i>small-size</i>).	49
3.3.1 – Valores de p da ANOVA TRIFACTORIAL MISTA aplicada aos quatro parâmetros do comportamento de acasalamento.	52
3.3.2 – Valores de t e p do teste t de <i>Student</i> ao efeito da cor no desempenho do macho para cada tipo de fêmea.	54
3.3.3 – Valores de t e p do teste t de <i>Student</i> ao efeito do tipo de fêmea no desempenho do macho.	54
3.3.4 – Valores de t e p do teste t de <i>Student</i> à igualdade da média a $\arcsen\sqrt{0.5}$.	55
3.3.5 – Valores de t e p do teste t de <i>Student</i> à performance relativa das populações.	55

Introdução Geral

“From a remote period, in all parts of the world, man has subjected many animals and plants to domestication or culture. Man has no power of altering the absolute conditions of life; he cannot change the climate of any country; he adds no new element to the soil; but he can remove an animal or plant from one climate or soil to another, and give it food on which it did not subsist in its natural state.”

Charles Darwin (1868)

A domesticação é uma das temáticas mais clássicas da biologia evolutiva, podendo ser vista como a mais antiga experiência evolutiva imposta pelo Homem. A sua história remonta há cerca de 14000 anos, predominantemente no Médio-Oriente e Ásia (crescente fértil), sendo o cão e várias espécies de gado os primeiros animais domesticados (Mignon-Grasteau *et al.*, 2005). Desde então, algumas espécies vegetais foram também alvo de domesticação pelo Homem, que as transportou para além da sua área de origem (**figura 1**).

Em termos evolutivos, a domesticação pode ser definida como o conjunto de alterações genéticas resultante da introdução de populações naturais em ambientes controlados pelo Homem – cativeiro (Simões *et al.*, 2007).

Quando uma população não consegue contrariar o aumento do *stress* ambiental, a adaptação ou a extinção irão depender exclusivamente da sua capacidade para mobilizar variabilidade genética suficiente, de modo a enfrentar com sucesso essa alteração (Rodríguez-Trelles *et al.*, 1998). Por conseguinte, é fundamental a compreensão do processo adaptativo de populações naturais ao cativeiro (estudo das taxas evolutivas, quantificação do grau de diferenciação das populações, etc.), não só em estudos de evolução em geral, mas também nos relacionados com a problemática da conservação (Simões *et al.*, 2007). Particularmente, em programas de conservação *ex-situ*, as alterações evolutivas ocorridas durante a adaptação ao cativeiro poderão dificultar a reintrodução das populações nos respectivos ambientes naturais, comprometendo o seu sucesso (Frankham, 1995; Frankham *et al.*, 2000, 2002; Gilligan & Frankham, 2003).

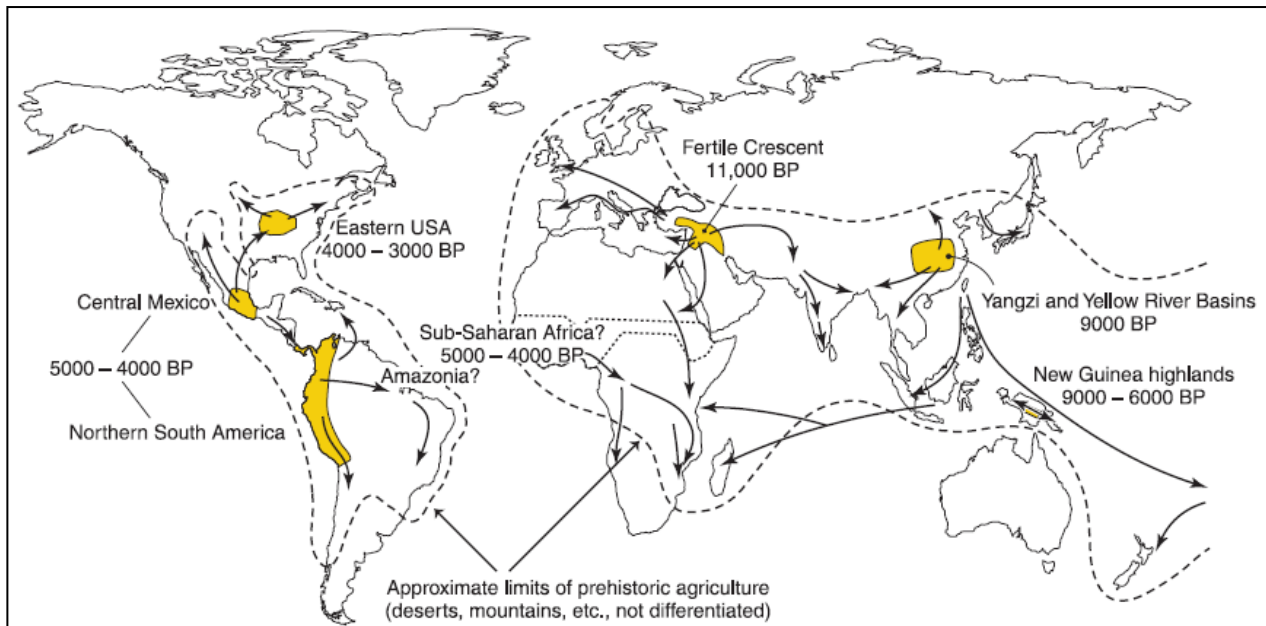


Figura 1 – Mapa arqueológico das primeiras culturas neolíticas e sua dispersão. Os valores indicam uma data (anos antes do presente) aproximada calculada através de ^{14}C . © Diamond & Bellwood, 2003.

Evolução experimental e *Drosophila*

“One of the most remarkable features in our domesticated races is that we see in them adaptation, not indeed to the animal's or plant's own good, but to man's use or fancy.”

Charles Darwin (1876)

A *Drosophila*, por ser um organismo de simples manutenção e manejo no laboratório (pequenas dimensões, fácil reprodução e ciclo de vida curto – **figura 2**) tem sido largamente utilizada em estudos evolutivos de populações sexuadas diplóides. Exemplos emblemáticos em que foi testada a importância do ambiente no padrão evolutivo de populações de *Drosophila*, através da análise à convergência de padrões evolutivos, são os estudos de evolução reversa. Nestes estudos, as populações sujeitas a ambientes diferentes são novamente colocadas num ambiente semelhante, de modo a verificar se voltam ao estado ancestral (e.g. Teotónio & Rose, 2000; Teotónio *et al.*, 2002).

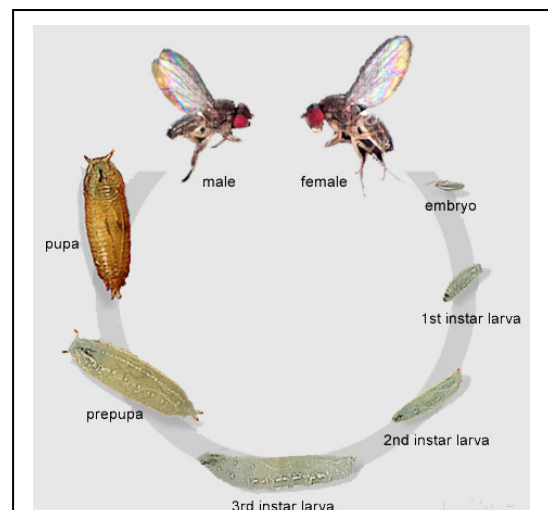


Figura 2 – Ciclo de vida da *Drosophila*.

© FlyMove (adaptado)

Outros exemplos são os trabalhos de domesticação evolutiva em *Drosophila* (e.g. Latter & Mulley, 1995; Sgrò & Partridge, 2000; Matos *et al.*, 2002, 2004; Gilligan & Frankham, 2003; Simões *et al.*, 2007; ver revisão em Simões *et al.*, 2009). A maioria destes estudos revela uma melhoria no desempenho de uma ou várias características da história da vida ao longo da adaptação ao ambiente ancestral ou novo.

A evolução experimental é a área da Biologia Evolutiva que se dedica a estudar os padrões evolutivos de populações analisadas em tempo real, sob condições (idealmente) bem definidas e reproduzíveis. Por permitir uma caracterização directa e pormenorizada das alterações evolutivas no processo de adaptação, é uma abordagem vastamente utilizada no estudo dos fenómenos evolutivos (Rose *et al.*, 1996). Um dos objectivos dos estudos de evolução experimental é a caracterização das potencialidades das populações em responder directamente à selecção, sendo que a maioria das características responde significativamente à selecção direccionada (Simões *et al.*, 2009). Não obstante, é também de elevado interesse descrever as alterações evolutivas envolvendo características que não estão a ser directamente seleccionadas, mas que apresentam uma resposta evolutiva devido à existência de correlações genéticas com outras mais directamente relevantes para a *fitness*. Por vezes ocorre uma quebra no desempenho de características funcionais, resultante da presença de compromissos (*trade-offs*) entre características (Service & Rose, 1985; Matos *et al.*, 2000; Chippindale *et al.*, 2004). Apesar do elevado interesse de estudos de evolução experimental aplicados à domesticação em *Drosophila*, estes são relativamente escassos. A maioria dos estudos de adaptação dessas espécies ao laboratório aplica o método comparativo, assumindo que diferenças entre populações diferindo no número de gerações em laboratório traduzem alterações temporais numa população (ver revisão em Simões *et al.*, 2009). Contudo, mais estudos de domesticação evolutiva em tempo real tornam-se essenciais para uma melhor caracterização de padrões e processos evolutivos subjacentes.

Problemática da Conservação – deterioração genética das populações

“In pushing other species to extinction, humanity is busy sawing off the limb on which it is perched.”

Paul Ehrlich, Stanford University

Actualmente, a diversidade biológica está a sofrer reduções drásticas devidas, directa ou indirectamente, à acção humana. Esta temática tem sido comumente designada por *Sexta Extinção* em virtude da sua magnitude ser comparável à das cinco extinções em massa (**figura 3**)

reveladas pelo registo fóssil (Frankham *et al.*, 2002). Enquanto que as grandes extinções em massa do passado foram causadas exclusivamente pela ocorrência de perturbações físicas, a *Sexta Extinção* parece ser o primeiro evento devido a causas biológicas (Eldredge, 2001). As extinções biológicas derivam da combinação de factores determinísticos (destruição de habitats, exploração antropogénica, introdução de espécies exóticas, poluição, etc.) e estocásticos (demográficos, ambientais, genéticos, etc.) (Frankham, 2005a). Os factores genéticos, em particular, afectam o risco de extinção porque as espécies ameaçadas apresentam geralmente populações pequenas e/ou em declínio, onde a consanguinidade e a perda de variabilidade genética são inevitáveis, aumentando previsivelmente ao longo das gerações com taxas superiores do que populações de maiores dimensões (Frankham *et al.*, 2002).

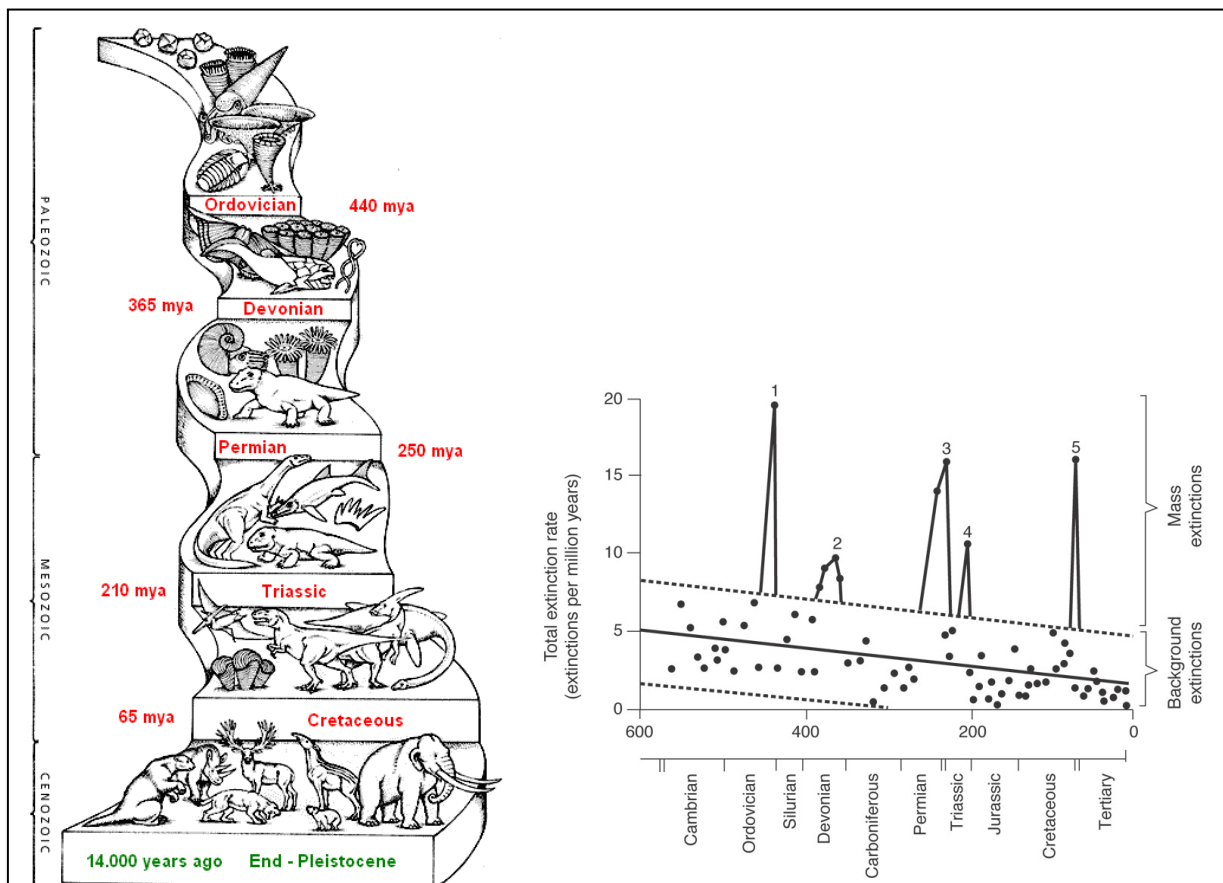


Figura 3a

Figura 3b

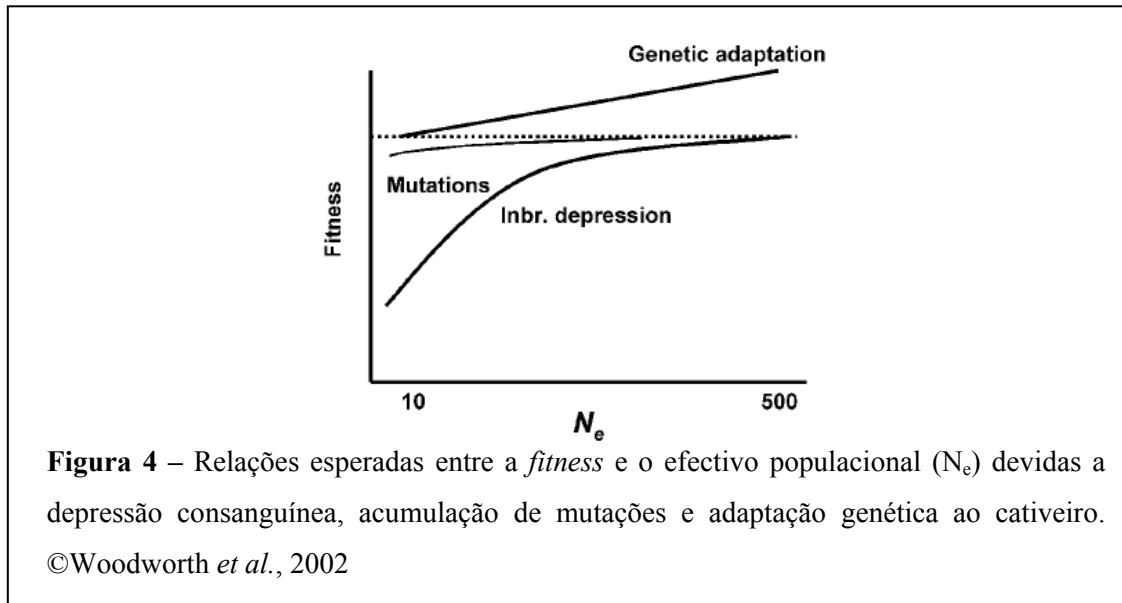
Figura 3 – As extinções em massa: **a)** Representação iconográfica dos principais grupos animais extintos em cada um dos cinco episódios de extinção em massa ocorridos ao longo do tempo geológico © 1998 *The American Museum of Natural History*. **b)** Variação da taxa de extinção de famílias marinhas ao longo do tempo geológico, evidenciando os cinco episódios de extinção em massa deduzidos a partir do registo fóssil © Raup & Sepkoski, 1982.

Desde os tempos de Darwin (1876) que se sabe que a consanguinidade diminui a capacidade de reprodução e de sobrevivência em populações naturais (depressão consanguínea) afectando, por exemplo, a produção de esperma, a capacidade de acasalamento, a fecundidade, a idade de maturação sexual e a sobrevivência juvenil e adulta (Frankham *et al.*, 2002). Espera-se, então, que a consanguinidade aumente o risco de extinção em situações em que outros factores estão controlados ou são excluídos, como em condições de cativeiro. Além disso, a perda de variabilidade genética em populações pequenas é também um factor influente na extinção das populações, na medida em que diminui o seu potencial evolutivo, ou seja, a sua capacidade de evoluir no sentido de lidar com as alterações ambientais (Frankham, 2005a).

Actualmente, muitas espécies têm como única alternativa à extinção a reprodução em cativeiro; os programas de conservação têm como objectivo a manutenção da variabilidade genética das populações cativas de modo a possibilitar uma futura reintrodução na natureza (Frankham *et al.*, 2002). Todavia, as populações sujeitas a longos períodos de cativeiro também sofrem alterações genéticas que podem comprometer a sua capacidade de viver e de se reproduzir quando reintroduzidas na natureza (Woodworth *et al.*, 2002; Gilligan & Frankham, 2003; Frankham, 2005a, 2005b, 2008).

As causas mais comuns de deterioração genética são: a depressão consanguínea, a perda de diversidade genética por deriva, a acumulação de mutações e as adaptações genéticas ao cativeiro, que aumentam a *fitness* a esse ambiente mas são potencialmente deletérias em ambientes naturais. Cada uma dessas causas apresenta uma relação distinta com o efectivo populacional (**figura 4**): a depressão consanguínea, a perda de variabilidade por deriva e a acumulação de mutações deverão ser mais severas em populações pequenas e as adaptações genéticas ao cativeiro deverão ser maiores em populações cujo efectivo é mais elevado. Estabelece-se assim um equilíbrio entre deriva e selecção, sendo a primeira predominante em populações pequenas e a segunda em populações grandes (Woodworth *et al.*, 2002).

Apesar de não existir claro consenso no que concerne à gestão de programas de conservação *ex-situ*, têm sido sugeridas várias estratégias para atenuar as alterações genéticas decorrentes de longos períodos em ambiente cativo. Entre elas destacam-se a fragmentação de populações de espécies ameaçadas em subpopulações panmícticas de menor efectivo com troca esporádica de material genético (Margan *et al.*, 1998; Woodworth *et al.*, 2002; Frankham, 2005b, 2008), a equalização da contribuição de famílias (Rodríguez-Ramilo *et al.*, 2006) e a manutenção, quando possível, de populações de grandes dimensões sujeitas a stress variável (Reed *et al.*, 2003).



Domesticação experimental – metodologias de estudo

A maioria dos trabalhos sobre domesticação utiliza, como indicador das alterações evolutivas, estimativas de *fitness* relativa a um *stock* de referência, não analisando características individuais que poderão contribuir para o sucesso reprodutivo geral das populações em estudo (Frankham, 2005b; Rodríguez-Ramilo *et al.*, 2006; Simões *et al.*, 2009). Como consequência do “Teorema Fundamental da Selecção Natural” de Fisher, perto do equilíbrio evolutivo, a *fitness* deverá exibir reduzida variância genética aditiva e estar altamente dependente da depressão consanguínea (Sharp, 1984). Por outro lado, é possível que as características da história da vida mantenham alguma variância genética aditiva mesmo perto do equilíbrio evolutivo, *e.g.* por pleiotropia antagónica com outras características também relevantes. No entanto, longe do equilíbrio genético e evolutivo, este cenário pode alterar-se – por exemplo, efeitos de interacção genótipo-ambiente podem conduzir a alterações gerais das matrizes de variância-covariância genética aditiva, envolvendo, quer as características individuais, quer a *fitness* global (Falconer & Mackay, 1996; Lynch & Walsh, 1998). Assim, uma análise simultânea da *fitness* e de potenciais características individuais que para ela contribuam é de enorme interesse na compreensão dos mecanismos evolutivos subjacentes às alterações das populações durante a dinâmica adaptativa.

Estudos de domesticação analisando características individuais têm focado a atenção nas características da história da vida (“*life-history traits*”), como a fecundidade, o tempo de desenvolvimento e a resistência a factores de *stress* ambiental (*e.g.* Sgrò & Partridge, 2000;

Matos *et al.*, 2000, 2002, 2004; Simões *et al.*, 2007, 2008a; ver revisão em Simões *et al.*, 2009). Apesar de vários comportamentos terem uma elevada relevância em termos do sucesso reprodutivo diferencial (ou seja, em termos da *fitness*), as alterações evolutivas de características comportamentais são uma temática ainda muito pouco abordada em estudos de domesticação. Vários estudos têm sido feitos em *Drosophila* com o objectivo de caracterizar os diferentes tipos de comportamento e a sua determinação genética (Maynard Smith, 1956; Singh & Singh, 2003; Mackay *et al.*, 2005; Mueller *et al.*, 2005; Edwards *et al.*, 2006). No entanto, existem relativamente poucos trabalhos que caracterizem a evolução do comportamento durante a adaptação a um novo ambiente (Grant & Mettler, 1969; Steele, 1986a, 1986b; Sokolowski *et al.*, 1997; Huey *et al.*, 2003; Mueller *et al.*, 2005). O comportamento de acasalamento em *Drosophila* é um importante componente da *fitness* e apresenta variabilidade nas populações naturais (Moehring & Mackay, 2004). Esta característica poderá ter um impacto relevante no desempenho das populações, quando os indivíduos são introduzidos num novo ambiente (devido a alterações de, por exemplo, densidade, espaço, luz, disponibilidade de nutrientes, etc.). Salienta-se que, caso seja seleccionado durante a adaptação, o comportamento de acasalamento poderá sofrer grandes alterações.

Outra abordagem muito importante em domesticação, nomeadamente pela sua aplicabilidade à problemática da fragmentação de populações, é o estudo de populações com diferente efectivo. Como já foi referido, a consanguinidade é inevitável em populações fechadas de efectivo reduzido, na medida em que (com o decorrer das gerações) todos os indivíduos se tornam cada vez mais aparentados. Consequentemente, espera-se um aumento da frequência de indivíduos homozigóticos, a diminuição de heterozigóticos e a acumulação de depressão consanguínea nestas populações. Com o cruzamento entre populações (formação de populações híbridas) espera-se um aumento da frequência de heterozigotia, a diminuição da consanguinidade e, por conseguinte, uma redução na depressão consanguínea, traduzida num aumento da *fitness* da descendência resultante – heterose (Frankham *et al.*, 2002).

Muitos autores defendem que a melhor gestão de populações em cativeiro é a sua fragmentação em pequenas subpopulações panmícticas, desde que seja possível a troca esporádica de material genético (Margan *et al.*, 1998, Woodworth *et al.*, 2002; Frankham, 2005b). Uma metapopulação (*pooled population*) resultante de várias pequenas populações terá maior diversidade genética, menor consanguinidade (consequentemente, inferior depressão consanguínea) e menor adaptação ao cativeiro do que uma única grande população com dimensão equivalente (assumindo a não extinção de subpopulações); assim, a variabilidade nas subpopulações é reduzida por deriva genética, sendo mantida ao nível da metapopulação – esta

estratégia de conservação é deveras benéfica para a gestão de populações em cativeiro e, em especial, para os programas de reintrodução em ambiente natural (ver Margan *et al.*, 1998, Frankham, 2005b, 2008).

Nos últimos 20 anos, o Grupo de Evolução Experimental (CBA-FCUL) tem vindo a analisar a evolução laboratorial de populações de *Drosophila subobscura* Collin, 1936, desde a sua fundação a partir de colheitas na Natureza. Têm sido abordadas diversas características da história da vida, sendo de esperar que a maioria delas apresente uma estreita relação com a *fitness* e, como tal, que ocorra uma melhoria progressiva no seu desempenho, pelo menos numa fase inicial do processo adaptativo. Estas expectativas, assim como a semelhança entre taxas e padrões evolutivos entre populações (a curto e longo prazo) têm vindo a ser testadas. Os estudos desta equipa indicam a existência de clara dinâmica adaptativa durante a domesticação, assim como de convergência evolutiva entre populações (Matos *et al.*, 2000, 2002, 2004; Simões *et al.*, 2007, 2008a). Também indicam, contudo, a existência de contingências evolutivas, com diferentes valores de taxas evolutivas e/ou estados iniciais de adaptação entre populações derivadas de diferentes fundações a partir de populações naturais (Matos *et al.*, 2002; Simões *et al.*, 2007, 2008a).

“If a man will begin with certainties, he shall end in doubts; but if he will be content to begin with doubts, he shall end in certainties.”

Sir Francis Bacon

Apesar de todos os estudos já realizados, ainda existem várias questões por responder, nomeadamente sobre a magnitude dos efeitos da depressão consanguínea durante a adaptação ao cativeiro e sobre a influência da consanguinidade na dinâmica adaptativa (interacção deriva genética – selecção natural). Contribuindo para colmatar essas lacunas, o trabalho descrito nesta dissertação pretende comparar populações de efectivo reduzido (em condições de elevada consanguinidade) com outras de efectivo elevado (em condições de baixa consanguinidade) e diferentes tempos de permanência em laboratório (diversos estados de adaptação ao cativeiro). Para além dos estudos de características da história da vida periodicamente realizados pelo grupo de Evolução Experimental, serão abordadas outras como a *fitness* reprodutiva, em termos de número de descendentes, a *fitness* de híbridos de populações-réplica (*pooled populations*) e o comportamento de acasalamento.

Capítulo 1.

Características da História da Vida

1.1. Introdução

Há cerca de 18 anos que a equipa onde se insere o presente projecto tem vindo a analisar a evolução laboratorial de populações de *Drosophila subobscura* desde a sua fundação a partir de colheitas na Natureza. A adaptação ao cativeiro, com especial relevo na fase inicial do processo adaptativo, tem sido a principal problemática abordada pelo grupo. Várias características da história da vida (como a fecundidade e a resistência à inanição) têm sido analisadas, com o objectivo de testar a semelhança (a curto e longo prazo) de taxas e padrões evolutivos entre diferentes populações. Os estudos do grupo indicam a existência de clara dinâmica adaptativa durante a domesticação, assim como a de convergência evolutiva entre populações (Matos *et al.*, 2000, 2002, 2004; Simões *et al.*, 2007, 2008a).

Neste capítulo é estendido o estudo da dinâmica evolutiva das características da história da vida ao efeito do tamanho populacional, a influência da consanguinidade e a acção (que se espera ocorrer em direcções opostas) da deriva genética e selecção natural.

Em populações de efectivo reduzido, a consanguinidade e a perda de variabilidade por deriva genética são inevitáveis, aumentando previsivelmente ao longo das gerações, a taxas superiores do que populações de maiores dimensões (Frankham *et al.*, 2002). A relação entre o tamanho da população, a perda de variabilidade genética e a consanguinidade em populações panmícticas fechadas pode ser descrita através da equação:

$$H_t / H_0 = [1 - 1 / (2N_e)]^t = 1 - F \quad (\text{Eq. 1})$$

onde H_t é a heterozigosidade (esperada no equilíbrio Hardy–Weinberg) na geração t , H_0 é a heterozigosidade inicial, N_e é o efectivo populacional e F o coeficiente de consanguinidade (Falconer & Mackay, 1996). Na medida em que o termo médio da equação é aproximadamente igual a $e^{-t/2N_e}$, esta equação prevê um declínio exponencial da diversidade genética com o decorrer das gerações, ocorrendo a maior taxa quanto menor for o efectivo da população (Frankham, 2005a) – **figura 1.1.1**. Por outro lado, os efeitos estocásticos da deriva genética num efectivo populacional reduzido conduzem à diversificação entre populações com a mesma origem (*e.g.* populações fragmentadas) devido à perda de heterozigosidade diferencial entre populações pequenas (Frankham, *et al.*, 2002). Espera-se, então, que o efeito combinado dos

vários factores de deterioração genética leve à diminuição da *fitness* das populações pequenas relativamente às de maior dimensão (ver *Introdução Geral*, figura 4).

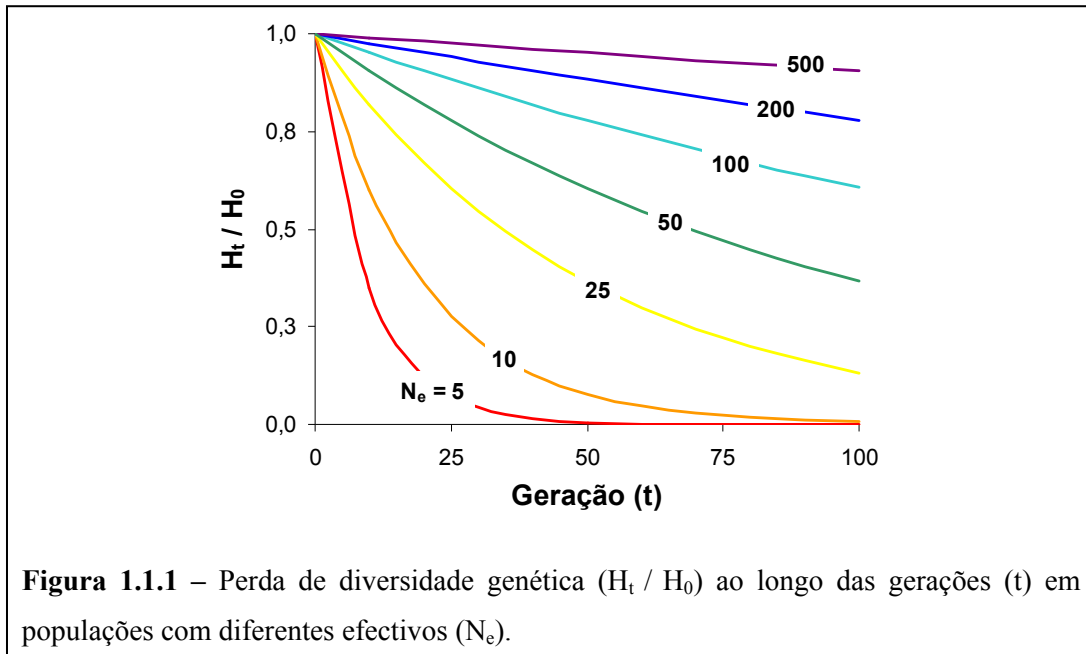


Figura 1.1.1 – Perda de diversidade genética (H_t / H_0) ao longo das gerações (t) em populações com diferentes efectivos (N_e).

A depressão consanguínea varia directamente com o coeficiente de consanguinidade, numa relação aproximadamente linear (Falconer & Mackay, 1996); assim, a *fitness* será proporcional a $[1 - F]$ (ver Eq. 1):

$$\text{Fitness} = k (1 - F) = k [1 - 1 / (2N_e)]^t \approx e^{-t/2N_e} \quad (\text{Eq. 2})$$

onde **k** é uma constante.

Por outro lado, a perda de variabilidade genética é um factor muito importante na evolução e extinção das populações (em especial nas de efectivo reduzido), na medida em que diminui o seu potencial evolutivo, ou seja, a capacidade das populações evoluírem no sentido de lidar com as alterações ambientais (Frankham, 2005a).

A taxa evolutiva (resposta à selecção) é determinada principalmente pela variância genética quantitativa (Franklin, 1980) e é prevista pela seguinte equação (Falconer & Mackay, 1996):

$$R = S h^2 \quad (\text{Eq. 3})$$

onde **S** é o diferencial de selecção (diferença na média das características quantitativas entre os indivíduos seleccionados e todos os indivíduos da população) e h^2 a heritabilidade (proporção da variância fenotípica devida a variância genética aditiva – V_A / V_P).

Partindo da premissa de que para a variância genética apenas contribui variância genética aditiva (ou seja, não há efeitos de dominância ou epistasia relevantes), a resposta máxima à selecção (teoria do limite da selecção) é dada por:

$$R_{\max} = 2N_e i h^2 \sigma_p \quad (\text{Eq. 4})$$

em que i é o diferencial de selecção padronizado e σ_p o desvio-padrão fenotípico (Robertson, 1960). A resposta à selecção após t gerações (adaptação genética) é calculada através de:

$$R_t = S h_0^2 \sum_{i=1}^t [1 - 1 / (2N_{e,i})]^{t-1} \quad (\text{Eq. 5})$$

em que h_0^2 é a heritabilidade inicial (Frankham & Kingslover, 2004; Frankham, 2005b). Esta equação sugere uma relação directamente proporcional entre a adaptação genética e o efectivo populacional.

Assume-se que, na generalidade, existe variabilidade genética em quase todas as características em populações naturais (Lewontin, 1974). Apesar da selecção natural actuar sobre a variabilidade dos caracteres quantitativos (determinante do potencial evolutivo), a maior parte da informação que existe sobre diversidade genética em espécies ameaçadas é para a variabilidade molecular – alozimas e marcadores de DNA (Frankham *et al.*, 2002). Ambas estão relacionadas com a heterozigosidade, todavia, a sua correlação é baixa e não diferente de zero para características da história da vida (Reed & Frankham, 2001). A baixa correlação pode dever-se ao facto da selecção natural actuar de modo diferencial em *loci* moleculares neutros e em *loci* quantitativos, a variabilidade genética não-aditiva (dominância e epistasia) ou a desequilíbrio de *linkage*.

Em características pouco ligadas à *fitness* (com, principalmente, variância genética aditiva), as taxas de perda de variabilidade molecular e de variância genética quantitativa em populações pequenas não diferem significativamente (Gilligan *et al.*, 2005). Porém, as características mais relacionadas com a *fitness* exibem níveis mais elevados de variância não-aditiva (Cnokrak & Roff, 1995). Após diminuições drásticas no efectivo populacional, como efeitos de gargalo (“*bottlenecks*”), a variância genética não-aditiva pode ser convertida em aditiva, aumentando a taxa evolutiva (Robertson, 1952). Espera-se, contudo, que este efeito se sinta apenas a curto-prazo, pois a consanguinidade tenderá a diminuir a variância genética aditiva e, consequentemente, o potencial evolutivo da população. Vários estudos mostraram esta redução do potencial adaptativo, combinando os efeitos da depressão sanguínea e a perda de variabilidade genética (Frankham *et al.*, 2002). Mais estudos são necessários para caracterizar o grau de desajustamento das expectativas teóricas (que prevêem somente a existência de relações aditivas) e a dinâmica evolutiva real das populações (Gilligan *et al.*, 2005).

Neste capítulo pretende comparar-se populações de efectivo reduzido (em condições de elevada consanguinidade) com outras de efectivo elevado (em condições de baixa consanguinidade) e diferentes tempos de permanência em laboratório, de modo a avaliar o efeito da consanguinidade em várias características da história da vida e a influência da consanguinidade na dinâmica adaptativa das populações.

Espera-se que, nos regimes de efectivo populacional reduzido, ocorra uma diminuição de desempenho das características associadas à *fitness* (por depressão consanguínea), uma redução na resposta evolutiva (por redução da variabilidade genética) e um aumento da heterogeneidade entre populações (devido aos efeitos estocásticos da deriva genética). Nos regimes mais recentemente introduzidos em laboratório, prevê-se uma menor taxa evolutiva nas populações de efectivo reduzido ou mesmo a ausência de padrão evolutivo, pela anulação recíproca dos efeitos da deriva genética e selecção natural. Pelo mesmo motivo, nos regimes há mais tempo no ambiente laboratorial, a expectativa é de declínio do desempenho das populações mais pequenas.

1.2. Materiais e Métodos

Fundação das populações laboratoriais

As populações de *Drosophila subobscura* utilizadas no presente projecto são provenientes de diversas recolhas de populações naturais de um pinhal na Adraga (Sintra). Em Janeiro de 1990 foi fundada a população B (ver Matos *et al.*, 2000) e em Março de 1998, a população NW; após duas gerações a população NW foi replicada, assim como a população B (na sua geração 90), originando 5 populações-réplica cada: NB₁₋₅ e NW₁₋₅ (ver Matos *et al.*, 2002). Em Novembro de 2007 foi fundada a população XW, sendo replicada em 3 populações-réplica na 2ª geração após introdução em laboratório. A partir da replicação, as populações foram mantidas separadamente, sem cruzamento entre réplicas.

Para a replicação foi utilizada a postura de 24 horas de cada tubo de adultos da nova população, sendo os ovos distribuídos equitativamente pelos tubos de cada réplica a formar. Para facilitar a terminologia, o termo “*regime*” passará a designar o conjunto de populações-réplica com a mesma origem; por exemplo, regime XW designa o conjunto de populações-réplica que foram fundadas em 2007 a partir da população natural. Assim, foram usadas no presente estudo as populações NB₁₋₃, NW₁₋₃ e XW₁₋₃, adiante designadas por populações “*large-size*”.

Fundação das populações em regime de efectivo reduzido

A 14 de Junho de 2007 foram fundadas seis novas populações (PW₁₋₃ e IC₁₋₃), adiante designadas populações “*small-size*”. As populações PW₁, PW₂ e PW₃ derivaram da postura de ovos de 25 fêmeas XW₁, XW₂ e XW₃ (respectivamente) na 3ª geração em laboratório; as populações IC₁, IC₂ e IC₃ derivaram da postura de ovos de 25 fêmeas NW₁, NW₂ e NW₃ (respectivamente) na 119ª geração em laboratório (síncrone com as gerações do regime XW).

Manutenção das populações laboratoriais

As populações *large-size* em fase adulta foram mantidas com um valor médio de 800 indivíduos (num máximo de 1200) e as populações *small-size* com um valor médio de 49 indivíduos (num máximo de 50).

O meio de cultura para manutenção das populações é o utilizado desde a fundação da população B e está descrito em Matos *et al.* (2000). Este meio é composto por levedura de cerveja, farinha de milho, agar, nipagina e carvão em pó. Excepto durante o manuseamento, as

populações são mantidas em incubadoras *Memmert* ajustadas a 18° C, com fotoperíodo de 12hL:12hE. As populações foram divididas por duas incubadoras, sendo colocadas em grades 6x4, com 12 tubos de uma população para os regimes *large-size* e 1 a 2 tubos para os regimes *small-size*.

O desenvolvimento ocorreu em tubos com cerca de 3 mL de meio, a densidade controlada (aproximadamente 70 ovos por tubo), demorando entre 17 e 22 dias desde a recolha de ovos. Ao quarto ou quinto dia de emergência de adultos, todas as moscas de cada população foram cuidadosamente misturadas com ajuda de anestesia com CO₂ e colocadas em tubos a uma densidade de 50 indivíduos por tubo. De dois em dois dias, foram transferidas para um novo tubo contendo meio fresco, até ao dia da recolha de ovos para a geração seguinte. Para a recolha foi utilizada a postura de 24 horas de cada população, quando as fêmeas estavam entre os 7 e 11 dias de idade, sendo o tempo de geração de 28 dias.

Ensaio de características da história da vida

Foram sujeitas a ensaio as populações PW, IC, XW, NW e NB. O número de gerações em regime *small-size* e o tempo de permanência em laboratório das populações no momento de cada ensaio estão indicados na **tabela 1.2.1**.

Para cada população em estudo foi formada uma amostra de 16 casais com imagos provenientes do 2º dia de emergências do ensaio de *fitness* (ver capítulo 2). A formação de pares foi feita recorrendo a anestesia com CO₂. Os casais foram dispostos nas grades em filas de 4 tubos pertencentes à mesma população, em posição aleatória em cada grade do bloco correspondente, evitando assim efeitos ambientais entre regimes. A fecundidade diária foi registada durante os primeiros 12 dias, após os quais as moscas foram testadas para a resistência à inanição, através da transferência para um tubo com meio de agar e verificação da mortalidade individual de 6 em 6 horas. Ao longo dos ensaios, a posição das grades na incubadora foi aleatorizada diariamente, para evitar efeitos ambientais relacionados com a localização das grades.

Foram ensaiados os seguintes parâmetros:

- ***Idade da Primeira Reprodução (A1R)*** – número de dias que decorre desde a emergência das fêmeas até à primeira postura;
- ***Fecundidade Precoce (F1-7)*** – somatório do número de ovos postos por cada fêmea, durante os primeiros 7 dias de vida, após a emergência;

- **Fecundidade de Pico (F8-12)** – somatório do número de ovos postos por cada fêmea, entre os 8º e 12º dias de vida, após a emergência;
- **Resistência à Inanição de Machos (RM)** – número de horas que o macho sobrevive sem alimento;
- **Resistência à Inanição de Fêmeas (RF)** – número de horas que a fêmea sobrevive sem alimento.

Tabela 1.2.1 – Ensaio de características da história da vida: tempo de permanência em laboratório e em regime de efectivo reduzido (*small-size*).

ENSAIO	TEMPO (GERAÇÕES)	PW	IC	XW	NW	NB
G6	Laboratório	9	125	9	125	215
	Regime <i>small-size</i>	6		*****	*****	*****
G10	Laboratório	13	129	13	129	219
	Regime <i>small-size</i>	10		*****	*****	*****
G14	Laboratório	17	133	17	133	223
	Regime <i>small-size</i>	14		*****	*****	*****

Análise estatística

Para a análise dos dados foram utilizados os programas informáticos MICROSOFT EXCEL® 2003 e STATSOFT STATISTICA® 8.0. As hipóteses nulas (adiante designadas por H_0) foram testadas a um nível de significância de 5% ($p < 0.05$).

As populações NB são as que estão há mais tempo em laboratório; como tal, são consideradas as mais adaptadas a este ambiente, tendo sido escolhidas como linha de base para a comparação com as populações mais jovens. Optou-se, então, pela utilização dos valores relativos à população-controlo ($\text{regime}_X\text{-NB}_X$) de todos os parâmetros analisados. Esta abordagem, para além de requerer a sincronia dos ensaios, está limitada pela possibilidade de oscilações na população-controlo (ou seja, da sua própria dinâmica); todavia, por permitir extrair efeitos ambientais e eventuais efeitos evolutivos indesejáveis, é a que melhor se adequa à problemática definida e a que resulta em estimativas mais rigorosas (*e.g.* Teotónio & Rose, 2000; Matos *et al.*, 2002; Simões *et al.*, 2007, 2008a).

A primeira abordagem deste estudo incidiu sobre o efeito do tempo de permanência em laboratório e do tamanho da população, em cada um dos ensaios (G6, G10 e G14), nas 5

características da história da vida (A1R, F1-7, F8-12, RM e RF). Para tal, aplicou-se a cada ensaio uma ANOVA TRIFACTORAL MISTA, segundo a expressão:

$$Y = \mu + LT + PS + LT*PS + \text{Réplica } \{LT*PS\} + \varepsilon$$

em que Tempo em Laboratório (LT) e Tamanho da População (PS) são factores fixos e RÉPLICA é factor aleatório (aninhado na interacção “LT*PS”). O factor LT tem duas categorias (ST – SHORT-TERM e LT – LONG-TERM) assim como o factor PS (SMALL e LARGE).

Para estudar a variação das características ao longo das gerações (G), aplicou-se uma ANOVA TETRAFACTORAL MISTA, segundo a expressão:

$$Y = \mu + LT + PS + G + LT*PS + LT*G + PS*G + LT*PS*G + \\ + \text{Réplica } \{LT*PS\} + \text{Réplica } \{LT*PS\}*G + \varepsilon$$

em que LT, PS e G são factores fixos e RÉPLICA é factor aleatório (aninhado na interacção “LT*PS”). O factor G tem três categorias – 6, 10 e 14.

Para averiguar se havia diferenças significativas entre as populações ao longo das gerações, tendo em conta o efeito do número de gerações na análise de variância e para testar a existência de alterações na dinâmica evolutiva, foi realizada uma análise de covariância (ANCOVA) com a geração a funcionar como covariável, segundo o modelo:

$$Y = \mu + LT + PS + G + LT*PS + LT*G + PS*G + LT*PS*G + \\ + \text{Réplica } \{LT*PS\} + \text{Réplica } \{LT*PS\}*G + \varepsilon$$

Com o objectivo de analisar a dinâmica evolutiva de todas as populações em estudo, traçaram-se as trajectórias evolutivas para as cinco características. Recorreu-se à regressão linear simples, utilizando o valor médio da diferença ao controlo das características para cada população-réplica como variável dependente e o número de gerações ensaiadas como variável independente. A significância das trajectórias foi determinada através do seguinte modelo ANCOVA:

$$Y = \mu + \text{Réplica} + G + \text{Réplica}*G + \varepsilon$$

em que G é a covariável e RÉPLICA é factor aleatório.

Para além dos dados das 3 gerações ensaiadas (G6, G10 e G14), utilizaram-se os de um outro ensaio, realizado na geração 1 dos regimes *small-size* que apenas incluiu os regimes XW, NW e NB. A cada população dos regimes *small-size* foi atribuído o valor médio da respectiva réplica do regime *large-size* do qual derivou. Para as trajectórias evolutivas dos regimes XW e

NW incluíram-se também os dados de outros dois ensaios, realizados nas gerações 7 e 11 a partir da fundação do regime XW (correspondentes às gerações 4 e 8 dos regimes *small-size*).

Para avaliar o efeito da deriva genética na variância das populações, testou-se a homogeneidade entre as populações-réplica, comparando os regimes *small-size* com *large-size* (em cada geração); utilizaram-se os valores médios da diferença ao controlo para cada característica e aplicou-se o teste de Brown-Forsythe (Olejnik & Algina, 1987).

Finalmente, compararam-se os valores teoricamente previstos da razão das respostas à selecção (adaptação genética) entre populações com diferentes efectivos populacionais com os valores observados nas mesmas populações. Os valores esperados da resposta à selecção foram calculados através da seguinte relação (Frankham & Kingslover, 2004; Frankham, 2005b):

$$R_t = S h_0^2 \sum_{i=1}^t [1 - 1 / (2N_{e,i})]^{t-1} \Rightarrow \frac{R_t(PW)}{R_t(XW)} = \frac{S_{PW} h_0^2_{PW} \sum [1 - 1 / (2N_e)]^{t-1}_{(PW)}}{S_{XW} h_0^2_{XW} \sum [1 - 1 / (2N_e)]^{t-1}_{(XW)}}$$

Como as populações PW derivaram das XW, então $S_{PW} = S_{XW}$ e $h_0^2_{PW} = h_0^2_{XW}$, pelo que

$$\frac{R_t(PW)}{R_t(XW)} = \frac{\sum [1 - 1 / (2N_e)]^{t-1}_{(PW)}}{\sum [1 - 1 / (2N_e)]^{t-1}_{(XW)}}$$

Utilizou-se $N_e = 0.25 N$, relação estimada por Simões *et al.*, 2008b. Os valores observados foram calculados através da equação de regressão de cada regime para a idade de primeira reprodução e fecundidades (resultante da análise previamente realizada).

Como consequência do Teorema do Limite Central, violações moderadas da normalidade têm efeito pouco relevante na robustez da análise de variância, desde que a homocedasticidade seja assegurada (Sokal & Rohlf, 1995). Nas análises efectuadas foram aceites pequenos desvios à normalidade (avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk) e a homocedasticidade foi verificada pelo teste de Brown-Forsythe; este teste mantém grande robustez e poder estatístico em distribuições significativamente desviadas da normal (Olejnik & Algina, 1987).

Apenas a análise da idade da primeira reprodução (A1R) no ensaio da geração 14 revelou heterocedasticidade entre as populações em estudo; a homocedasticidade foi alcançada através da aplicação da transformação log-linear: $y = \text{Log}_{10}(x+2)$, em que $x = A1R - NB$. A transformação foi exclusivamente aplicada à variável A1R nas análises que incluíram os dados individuais da geração 14 (ANOVA TRIFACTORIAL da G14, ANOVA TETRAFACTORIAL e ANCOVA).

1.3. Resultados

A ANOVA aplicada a cada um dos ensaios revelou a existência de diferenças significativas entre as populações há mais e menos tempo em laboratório (*factor LT*), não se registando diferenças no regime de tamanho populacional (*factor PS*) ou na interacção entre os dois factores (*LT*PS*), para a idade da primeira reprodução e fecundidades. Os dados da resistência à inanição não revelaram diferenças significativas nestes dois factores. Por outro lado, o factor aleatório *Réplica* revelou-se significativo em quase todas as características ensaiadas (**tabela 1.3.1**). Tal resultado indica que, apesar da elevada heterogeneidade entre réplicas, o tempo de permanência em laboratório é factor influente sobre as características associadas à fecundidade (**figuras 1.3.1-5**).

Tabela 1.3.1 – Valores de *p* da ANOVA TRIFACTORIAL MISTA aplicada a cada um dos ensaios (G6, G10 e G14) para cada uma das características estudadas. Os valores assinalados a vermelho indicam $p < 0.05$.

		A1R	F1-7	F8-12	RM	RF
Ensaio G6	LT	0.002654	0.000111	0.001694	0.990020	0.298577
	PS	0.950034	0.717062	0.509572	0.463343	0.660656
	LT*PS	0.944550	0.960140	0.708103	0.653485	0.690633
	Rép(LT*PS)	0.100513	0.003444	0.022619	0.005077	0.000465
Ensaio G10	LT	0.396949	0.013930	0.008363	0.972069	0.917318
	PS	0.547372	0.466860	0.591251	0.384861	0.953642
	LT*PS	0.520111	0.443125	0.512508	0.841404	0.610828
	Rép(LT*PS)	0.009680	$2.42 \cdot 10^{-7}$	$3.26 \cdot 10^{-7}$	0.000002	0.244513
Ensaio G14	LT	0.015726	0.000497	0.002346	0.805245	0.617067
	PS	0.687017	0.671077	0.771159	0.695007	0.426904
	LT*PS	0.422196	0.498436	0.548688	0.388172	0.809812
	Rép(LT*PS)	0.206299	0.000860	0.016343	0.000001	0.000958

A análise à variação das cinco características ao longo das gerações apontou apenas alterações temporais significativas (*factor G*) na idade da primeira reprodução e na resistência à inanição dos machos, mantendo-se consistente a influência do tempo em laboratório (melhor desempenho dos regimes *long-term* – NW e IC – relativamente aos *short-term* – XW e PW – em ambos os regimes de tamanho populacional) nas características associadas à fecundidade. Por outro lado, todas as características apresentaram heterogeneidade no termo de interacção entre gerações e réplicas (**tabela 1.3.2**). Resultados semelhantes foram obtidos através da análise de covariância (**tabela 1.3.3**). Os valores médios das cinco características da história da vida estão representados graficamente nas **figuras 1.3.1-5**.

Tabela 1.3.2 – Valores de p da ANOVA TETRAFACTORIAL MISTA aplicada às cinco características estudadas. Os valores assinalados a vermelho indicam $p < 0.05$.

	A1R	F1-7	F8-12	RM	RF
G	0.007215	0.619625	0.971371	0.044568	0.251420
LT	0.023891	0.000006	0.000092	0.905135	0.942890
PS	0.942799	0.482249	0.954571	0.977961	0.688957
G*LT	0.177503	0.473601	0.859019	0.925172	0.507583
G*PS	0.838615	0.725627	0.674193	0.308139	0.481827
LT*PS	0.811153	0.798044	0.995771	0.663126	0.878348
G*LT*PS	0.330303	0.575093	0.593983	0.360386	0.834053
Rép(LT*PS)	0.445494	0.794297	0.570917	0.009969	0.233687
G*Rép(LT*PS)	$1.58 \cdot 10^{-7}$	$6.95 \cdot 10^{-10}$	0.000001	0.000443	0.001831

Tabela 1.3.3 – Valores de p resultantes da ANCOVA aplicada às cinco características estudadas. Os valores assinalados a vermelho indicam $p < 0.05$.

	A1R	F1-7	F8-12	RM	RF
G	$1.33 \cdot 10^{-9}$	0.386457	0.929513	0.293600	0.177561
LT	0.000014	0.002782	0.017677	0.781831	0.268463
PS	0.319378	0.646003	0.689270	0.987529	0.343110
G*LT	0.004918	0.705853	0.805083	0.773578	0.346196
G*PS	0.313882	0.576328	0.789310	0.963527	0.339954
LT*PS	0.423892	0.488184	0.881031	0.214923	0.582809
G*LT*PS	0.315639	0.599805	0.879311	0.230499	0.670961
Rép(LT*PS)	0.433226	0.054183	0.195121	0.093515	0.024439
G*Rép(LT*PS)	0.070062	0.001963	0.013240	0.001118	0.001341

A1R - Geração * Tempo Laboratório * Tamanho População

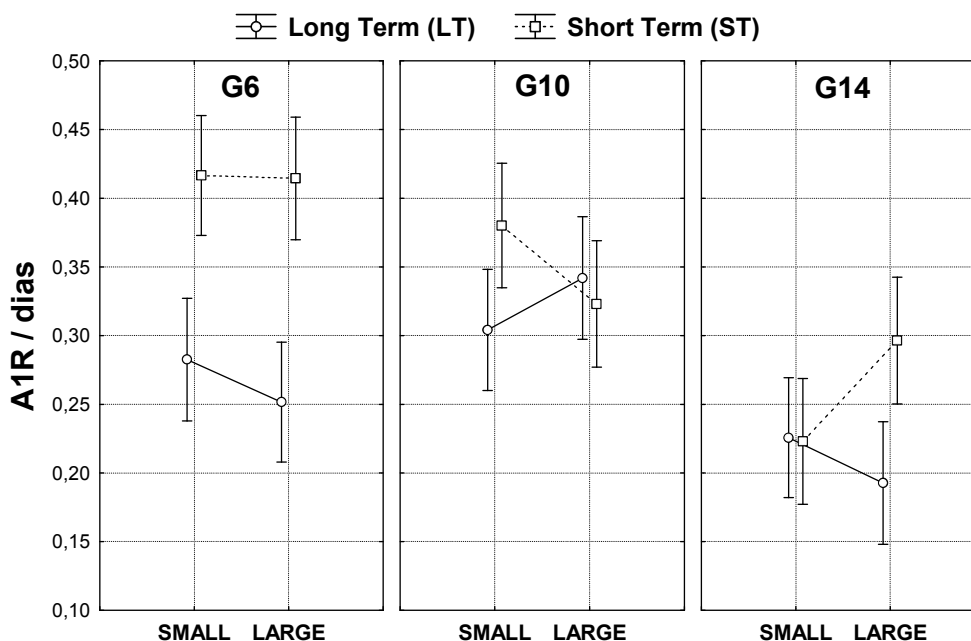


Figura 1.3.1 – Valores médios da idade da primeira reprodução (dados da diferença ao controlo, transformados por $\log_{10} x + 2$). As barras de erro correspondem aos intervalos de confiança a 95%, calculados com base no resíduo do termo de interacção (acima definido) da ANOVA TETRAFACTORIAL.

F1-7 - Geração * Tempo Laboratório * Tamanho População

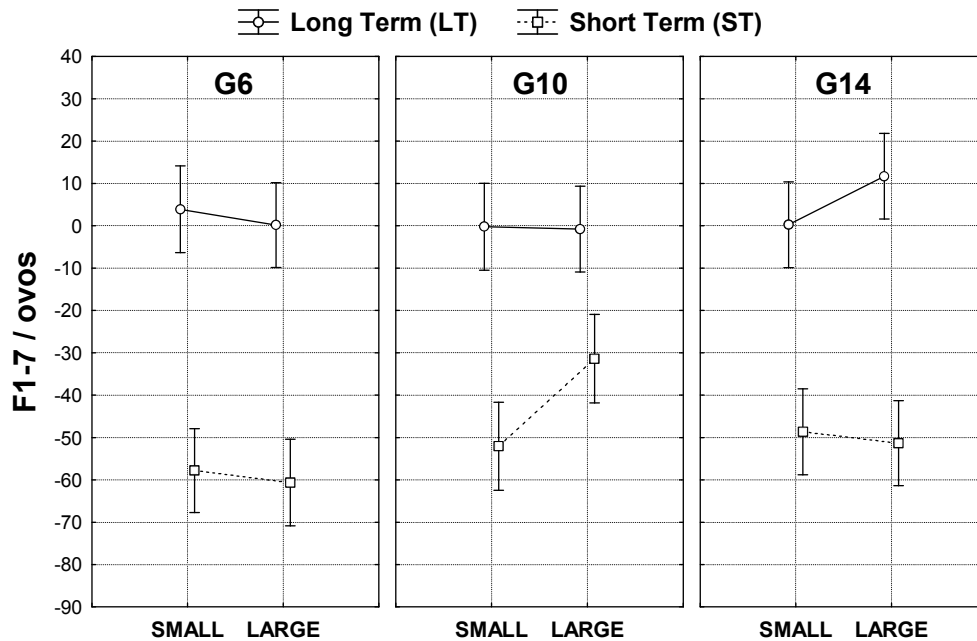


Figura 1.3.2 – Valores médios da fecundidade precoce (dados da diferença ao controlo). As barras de erro correspondem aos intervalos de confiança a 95%, calculados com base no resíduo do termo de interacção (acima definido) da ANOVA TETRAFACTORIAL.

F8-12 - Geração * Tempo Laboratório * Tamanho População

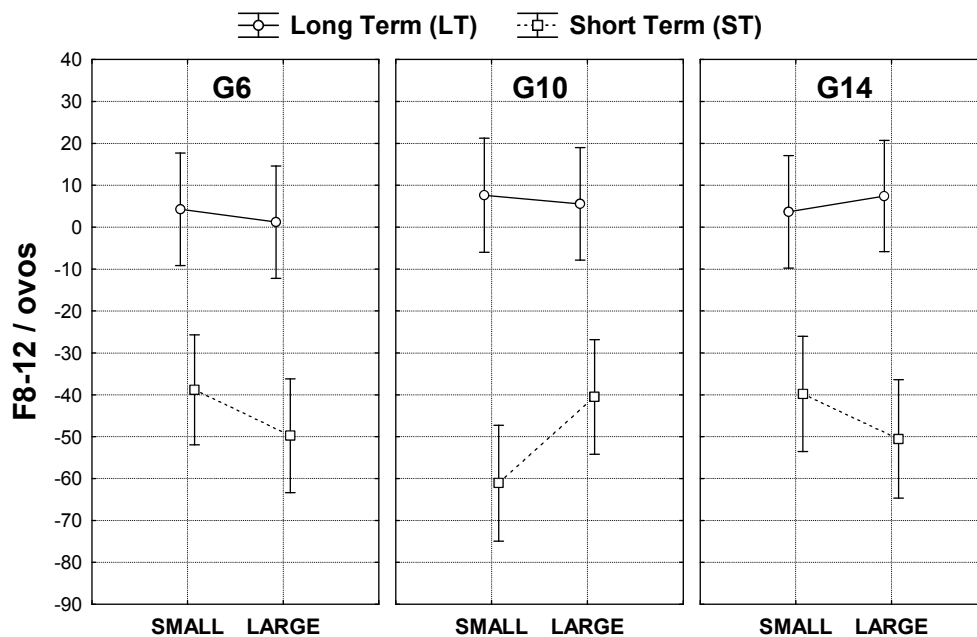


Figura 1.3.3 – Valores médios da fecundidade de pico (dados da diferença ao controlo). As barras de erro correspondem aos intervalos de confiança a 95%, calculados com base no resíduo do termo de interacção (acima definido) da ANOVA TETRAFACTORIAL.

RM - Geração * Tempo Laboratório * Tamanho População

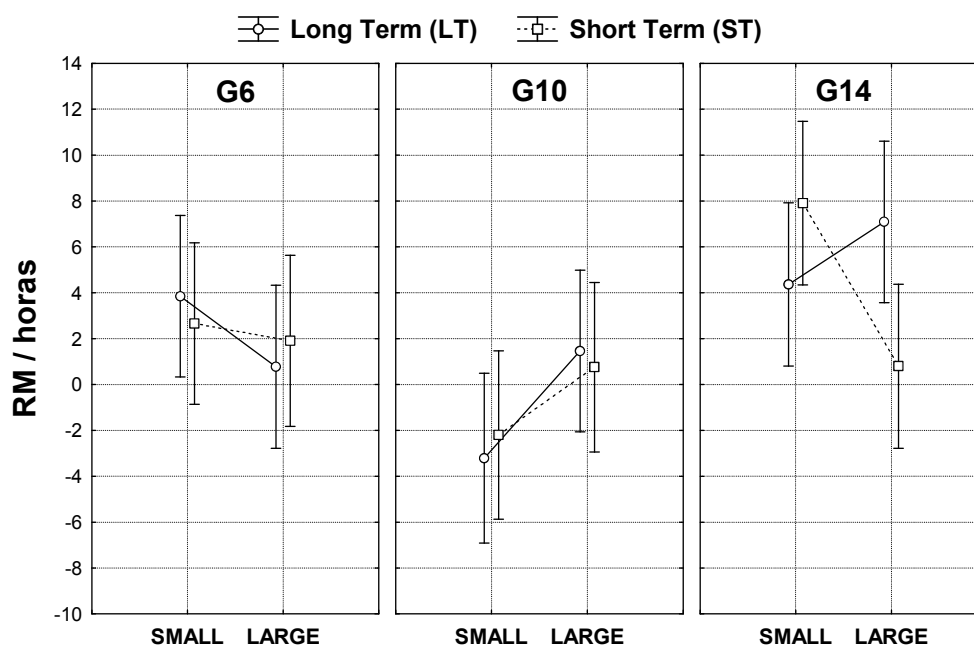


Figura 1.3.4 – Valores médios da resistência à inanição dos machos (dados da diferença ao controle). As barras de erro correspondem aos intervalos de confiança a 95%, calculados com base no resíduo do termo de interação (acima definido) da ANOVA TETRAFACTORIAL.

RF - Geração * Tempo Laboratório * Tamanho População

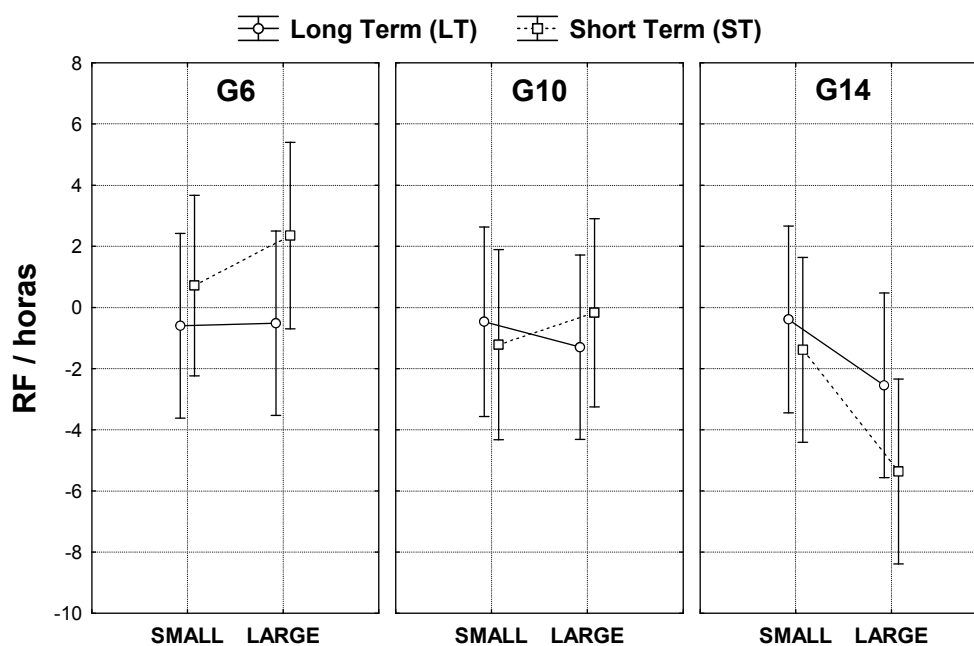


Figura 1.3.5 – Valores médios da resistência à inanição das fêmeas (dados da diferença ao controle). As barras de erro correspondem aos intervalos de confiança a 95%, calculados com base no resíduo do termo de interação (acima definido) da ANOVA TETRAFACTORIAL.

Os resultados referentes às trajectórias evolutivas de cada regime variaram consoante o regime selectivo e as características da história da vida em análise. Na generalidade, observou-se uma maior heterogeneidade entre populações-réplica nos regimes *small-size* (PW e IC) relativamente aos regimes *large-size* donde derivaram (XW e NW, respectivamente).

Para a idade da primeira reprodução (A1R) não se observou alteração temporal significativa em nenhum dos quatro regimes ($p > 0.05$), apesar da evidente divergência entre réplicas nos regimes de efectivo reduzido (**figura 1.3.6**).

Os resultados da fecundidade precoce (F1-7) corresponderam ao esperado: ambos os regimes *short-term* (PW e XW) revelaram diferenciação inicial significativa ($p < 0.01$), mas apenas XW mostrou alterações ao longo das gerações ($p < 0.001$), **figuras 1.3.7a-b**; os regimes *long-term* (IC e NW) não apresentaram quaisquer diferenças significativas (**figura 1.3.7c-d**).

As restantes características analisadas (fecundidade de pico e resistência à inanição) apenas revelaram heterogeneidade entre réplicas e interacção entre réplica e geração, estatisticamente significativas ($p < 0.05$) para o regime IC na resistência das fêmeas (**figuras 1.3.8-10**).

O teste de Brown-Forsythe à homogeneidade entre réplicas em cada geração não deu resultados significativos entre regimes *small-size* e *large-size* ($p > 0.05$) em nenhuma das características analisadas. Contudo, os resultados são na direcção esperada sobretudo para as características de fecundidade (*e.g.* F1-7 para PW e XW na geração 14, ver **figura 1.3.7a e b**).

Nos regimes *short-term*, a razão entre a resposta à selecção ao fim de 14 gerações prevista pelo modelo aditivo foi **0.791** e, nos regimes *long-term*, **0.787** – espera-se, então, uma diminuição de cerca de 20% na resposta das populações de efectivo reduzido. Os valores obtidos variaram consoante a característica em análise e estão descritos na **tabela 1.3.4**.

Para a idade da primeira reprodução, ambas as populações em efectivo reduzido mostraram uma maior resposta à selecção do que as populações em efectivo elevado (na ordem dos 20% para as *short-term* e dos 90% para as *long-term*). Para a fecundidade precoce, o regime PW apenas expressou uma redução de 8% na resposta evolutiva e as taxas evolutivas dos regimes *long-term* foram em direcções opostas (positiva para NW e negativa para IC). Para a fecundidade de pico, o regime PW indicou um aumento de cerca de 20% e o regime IC uma diminuição de cerca de 30%.

Tabela 1.3.4 – Razão entre os valores observados de resposta à selecção, para cada característica da história da vida, calculados através da equação de regressão do respectivo regime.

	$R_{14} \text{ PW} / R_{14} \text{ XW}$	$R_{14} \text{ IC} / R_{14} \text{ NW}$
A1R	1,1925	1,9212
F1-7	0,9287	-0,3570
F8-12	1,2394	0,6915

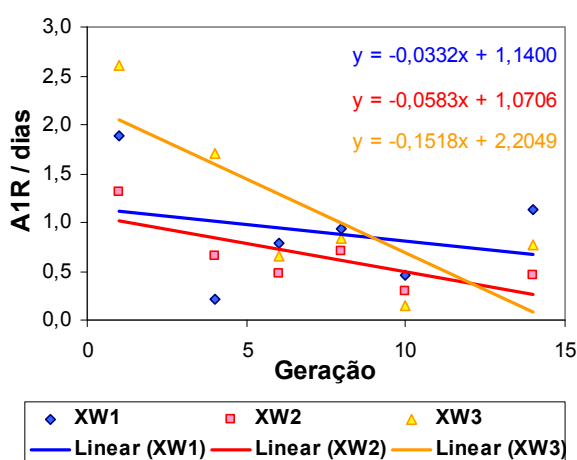


Figura 1.3.6a

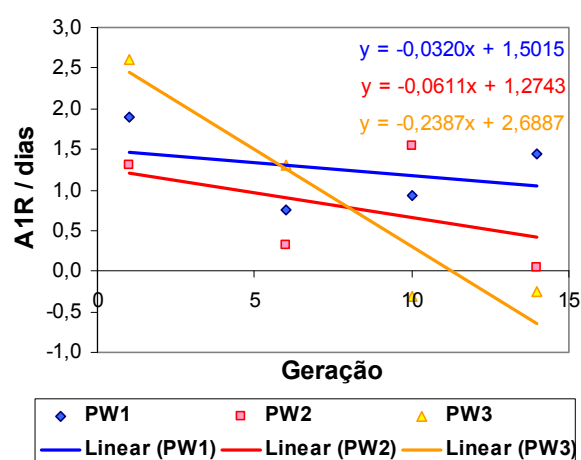


Figura 1.3.6b

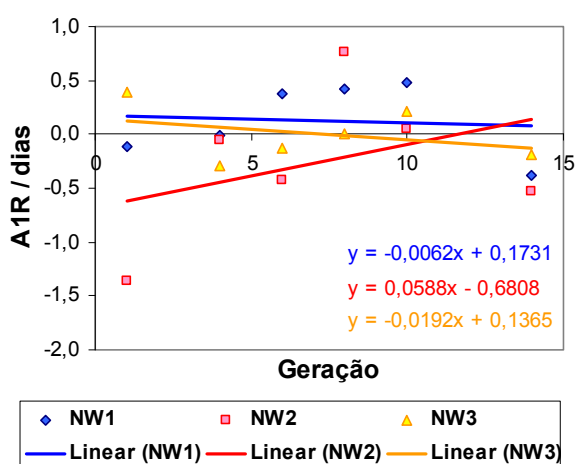


Figura 1.3.6c

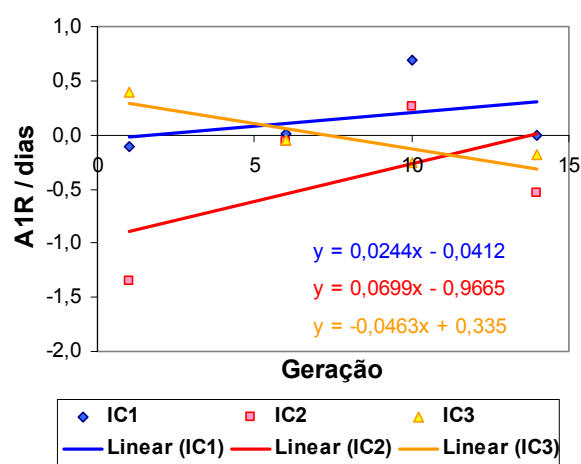


Figura 1.3.6d

Figura 1.3.6 – Trajectórias evolutivas para a idade da primeira reprodução. Os dados utilizados correspondem à diferença de valores médios entre cada réplica e a respectiva réplica-controlo, em cada geração: **a)** Regime XW; **b)** Regime PW; **c)** Regime NW; **d)** Regime IC.

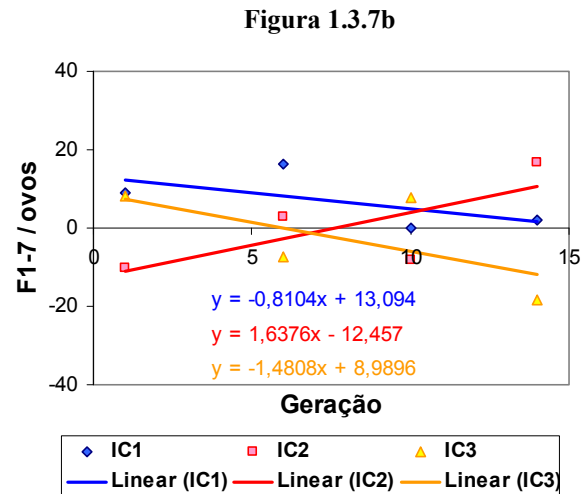
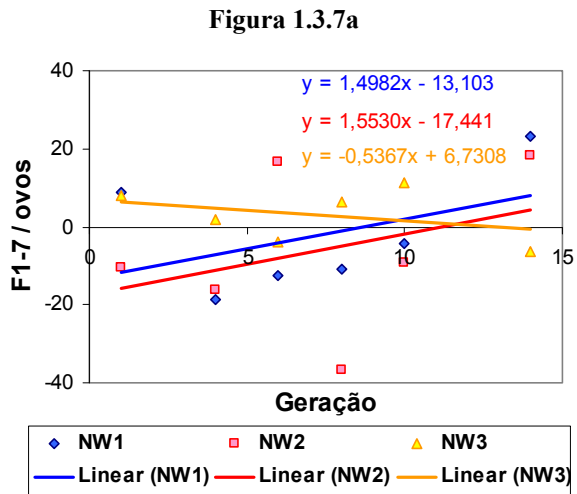
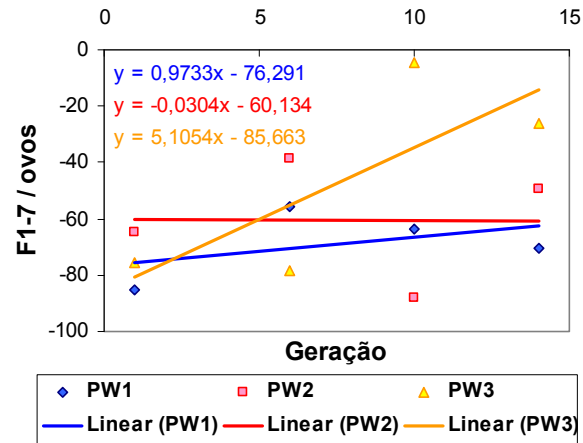
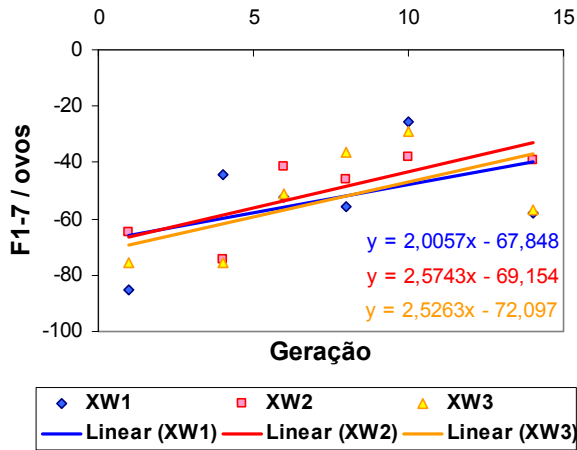


Figura 1.3.7 – Trajetórias evolutivas para a fecundidade precoce. Os dados utilizados correspondem à diferença de valores médios entre cada réplica e a respectiva réplica-controlo, em cada geração: **a)** Regime XW; **b)** Regime PW; **c)** Regime NW; **d)** Regime IC.

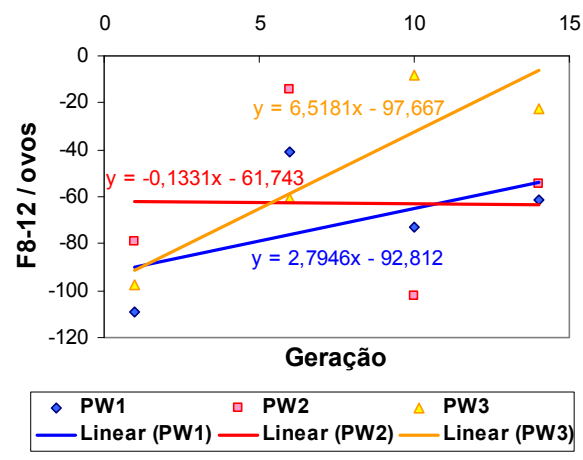
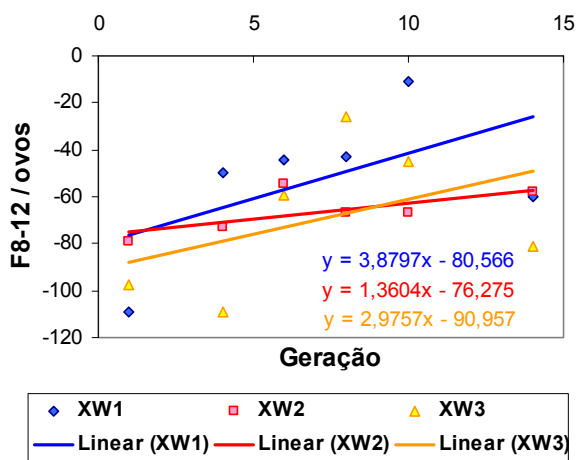


Figura 1.3.8 – Trajetórias evolutivas para a fecundidade de pico. Os dados utilizados correspondem à diferença de valores médios entre cada réplica e a respectiva réplica-controlo, em cada geração: **a)** Regime XW; **b)** Regime PW.

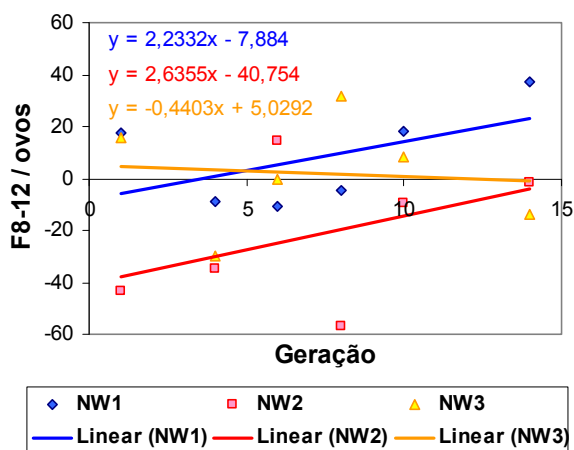


Figura 1.3.8c

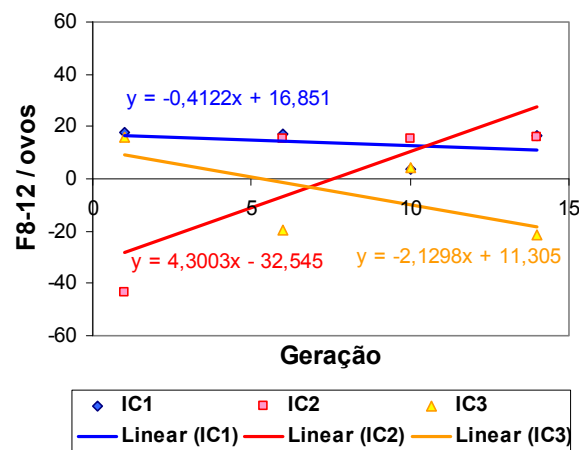


Figura 1.3.8d

Figura 1.3.8 (continuação) – Trajetórias evolutivas para a fecundidade de pico. Os dados utilizados correspondem à diferença de valores médios entre cada réplica e a respectiva réplica-controlo, em cada geração: **c)** Regime NW e **d)** Regime IC.

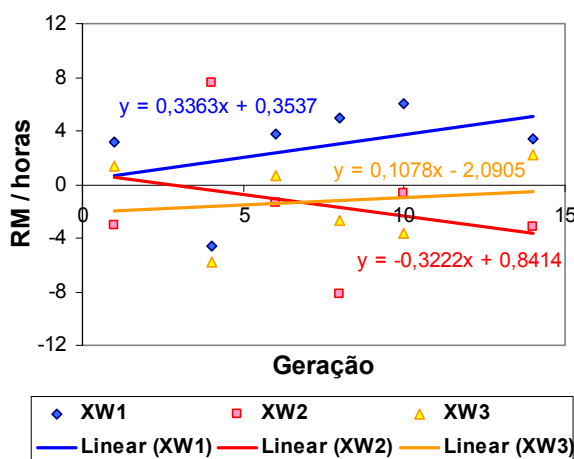


Figura 1.3.9a

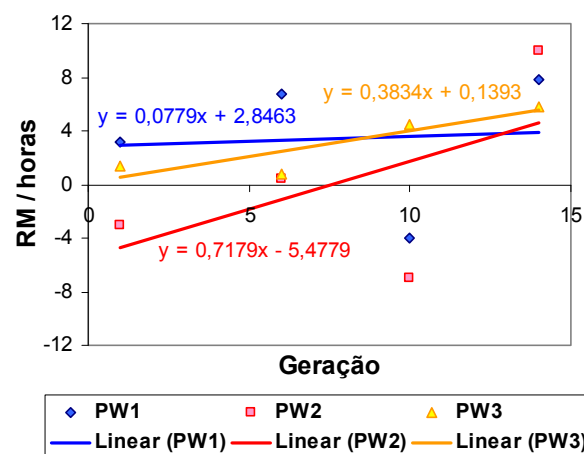


Figura 1.3.9b

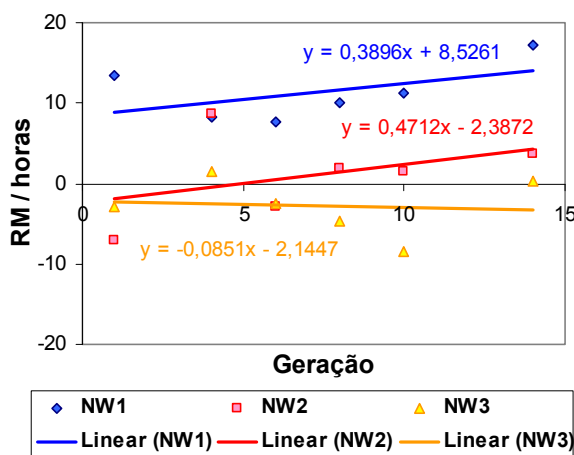


Figura 1.3.9c

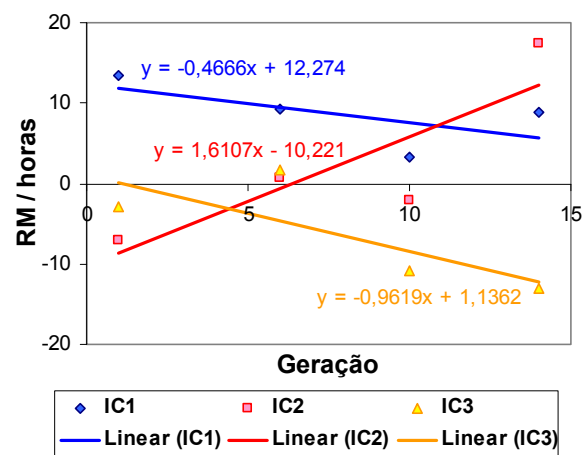


Figura 1.3.9d

Figura 1.3.9 – Trajetórias evolutivas para a resistência à inanição de machos. Os dados utilizados correspondem à diferença de valores médios entre cada réplica e a respectiva réplica-controlo, em cada geração: **a)** Regime XW; **b)** Regime PW; **c)** Regime NW; **d)** Regime IC.

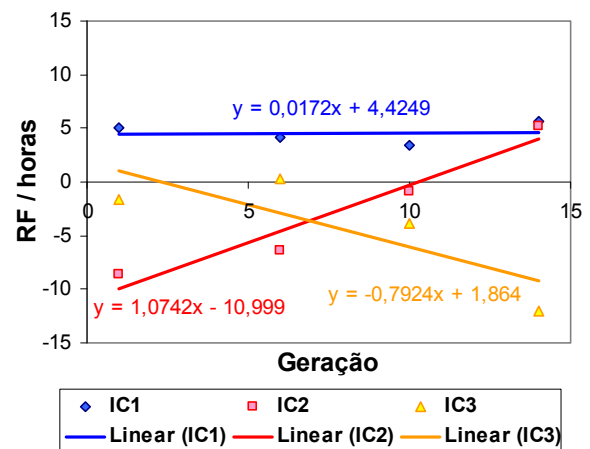
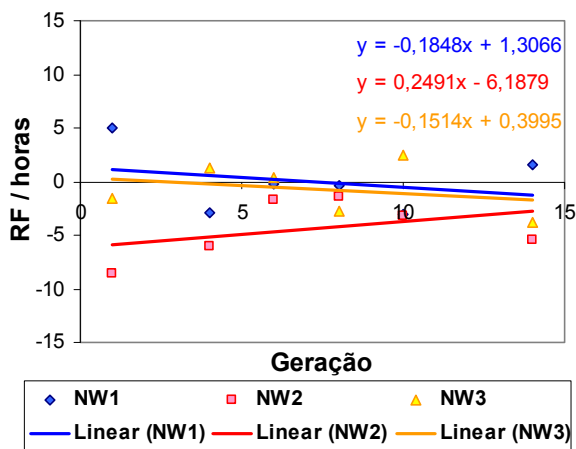
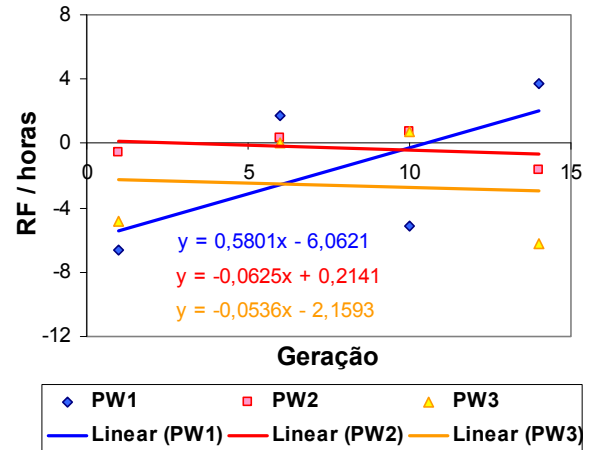
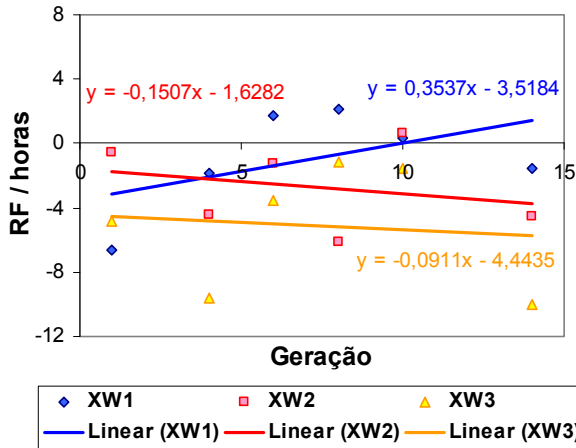


Figura 1.3.10 – Trajectórias evolutivas para a resistência à inanição de fêmeas. Os dados utilizados correspondem à diferença de valores médios entre cada réplica e a respectiva réplica-controlo, em cada geração: **a)** Regime XW; **b)** Regime PW; **c)** Regime NW; **d)** Regime IC.

1.4. Discussão

“I think I have found (here’s presumption!) the simple way by which species become exquisitely adapted to various ends.” Charles Darwin (carta a J.D. Hooker, 1844)

A adaptação ao laboratório é um facto?...

O laboratório pode assumir-se como apenas mais um ambiente da história evolutiva de uma população, donde se espera um padrão geral de adaptação (Matos *et al.*, 2000). A maioria dos estudos de domesticação evolutiva tem mostrado a ocorrência de uma melhoria no desempenho de várias características da história da vida ao longo da adaptação a um novo ambiente, levando à convergência entre populações há mais e menos tempo nesse ambiente (Gilligan & Frankham, 2003; Matos *et al.*, 2002, 2004; Simões *et al.*, 2007, 2008a).

Os resultados obtidos neste projecto corroboram os observados anteriormente: as populações com maior tempo de permanência em laboratório revelaram uma tendência geral para melhor desempenho nas características associadas à fecundidade e menor taxa evolutiva do que as populações mais recentemente introduzidas. A resistência à inanição, característica menos relacionada com a *fitness*, não apresentou nenhum padrão evolutivo evidente, revelando apenas uma enorme diversidade entre populações-réplica. Matos *et al.* (2004) e Simões *et al.* (2007) obtiveram resultados semelhantes, apontando como possível causa a determinação genética complexa desta característica, tornando necessário um estudo mais extenso (envolvendo maior número de gerações) para clarificar o seu padrão evolutivo.

Deriva genética – estocasticidade ao serviço da variabilidade

A deriva genética é um processo evolutivo estocástico que altera as frequências alélicas de uma determinada população, numa dada geração. A acção da deriva genética leva à redução da variabilidade global das populações, sendo tanto mais violenta quanto menor o efectivo populacional (Hartl & Clark, 1989; Woodworth *et al.*, 2002). Por outro lado, se duas populações estiverem sujeitas ao mesmo regime selectivo, a acção da deriva genética levará à divergência entre elas, contrariando o efeito da selecção natural (Frankham *et al.*, 2002). Apesar do teste de Brown-Forsythe não dar resultados significativos, observou-se consistentemente um aumento da heterogeneidade entre populações-réplica nos regimes *small-size* em relação aos *large-size*; o resultado do teste pode ser causado pelo enorme erro associado às estimativas de variância.

Efectivo populacional – does size really matter?...

As populações em ambiente natural ou cativo estão sujeitas a um conjunto de processos estocásticos (demográficos, ambientais, genéticos, etc.) que exercem forte influência sobre o seu percurso evolutivo, podendo levá-las à extinção (Woodworth *et al.*, 2002). Quanto menor for o efectivo populacional, maior será a consanguinidade e a perda de variabilidade genética, sendo por conseguinte esperada uma menor *fitness*, menor potencial evolutivo e menor resposta evolutiva (Frankham *et al.*, 2002).

“A grande tragédia da ciência: o massacre de uma bela hipótese por parte de um horrível facto.”

Thomas Huxley

Neste trabalho não foram encontradas diferenças significativas entre os dois regimes de efectivo populacional, em nenhuma das cinco características abordadas. Não obstante, obtiveram-se resultados no sentido esperado: os dados sugerem, na generalidade, uma diminuição no desempenho das características associadas à fecundidade nas populações de efectivo reduzido. Ambos os regimes *short-term* (PW e XW) mostraram maior taxa evolutiva do que os *long-term*, verificando-se um abrandamento na dinâmica evolutiva nas populações pequenas (PW), provavelmente devido à anulação recíproca efeitos da deriva genética e selecção natural.

Uma população terá maior resposta evolutiva (adaptação genética), quanto maior for o seu potencial evolutivo; os regimes com maior tempo de permanência em laboratório, por estarem mais adaptados a este ambiente, deverão apresentar, na generalidade, menor resposta evolutiva. Por outro lado, a perda de variabilidade genética devida ao reduzido efectivo a que a população está sujeita deverá, de igual modo, traduzir-se na diminuição do seu potencial evolutivo e, consequentemente, numa menor resposta. Segundo o modelo teórico aditivo de Frankham & Kingslover (2004), as populações *small-size* deveriam sofrer uma redução de aproximadamente 20% na resposta evolutiva em relação às respectivas *large-size*. Tal expectativa não foi verificada nos resultados. É possível que para isso tenha contribuído o facto das características relevantes para a *fitness* (como a fecundidade) possuírem (plausivelmente) níveis elevados de variância genética não-aditiva, pelo que o modelo não conseguirá explicar com rigor a resposta à selecção deste tipo de características. Por exemplo, na fecundidade precoce, a resposta evolutiva das populações PW (*short-term, small-size*) foi superior ao teoricamente previsto (redução de apenas 8% em relação às populações XW); a matriz de

variâncias e covariâncias poderá ter sido estabilizada por efeitos de dominância e epistasia, canalizados para variância genética aditiva ao longo das gerações (Falconer & Mackay, 1996).

A redução do poder estatístico que, provavelmente, levou à generalidade destas observações deverá estar relacionada com: a baixa replicação do delineamento experimental (3 réplicas por regime) e a curta duração do estudo (14 gerações); talvez a grande heterogeneidade entre réplicas tenha impedido a observação de um padrão claro e/ou ainda não tenha decorrido tempo suficiente para a manifestação da depressão consanguínea. Estudos envolvendo elevada replicação e maior número de gerações permitirão aprofundar as questões aqui abordadas.

Capítulo 2.

Fitness e Híbridos de Populações-Réplica

2.1. Introdução

“It is difficult to commit to any one definition of fitness, because there are many legitimate definitions, each suited to a different purpose.” Richard E. Michod (2000)

O conceito de *fitness* (assim como o de *adaptação*) é um dos temas mais polémicos e debatidos em biologia evolutiva. Dunbar (1982), quando respondeu à acusação de tautologia da selecção natural, enunciou estes dois conceitos de forma independente, referindo-se à adaptação em termos de eficiência na resolução de problemas colocados pelo ambiente e à *fitness* em termos de sucesso reprodutivo diferencial. Com esta definição não se torna imediato que o sucesso reprodutivo conduza à adaptação, em termos de estado do organismo (e vice-versa). É possível que uma característica com maior valor adaptativo, em termos de uma função particular, possa ter menor *fitness* e se reduza ao longo das gerações – *e.g.* se ocorrer em pleiotropia antagónica com outra característica.

O estudo simultâneo da *fitness* e de características individuais é fundamental para a melhor compreensão dos mecanismos evolutivos subjacentes à dinâmica adaptativa; como tal, no presente capítulo pretende estender-se a análise da dinâmica evolutiva das características da história da vida à (estimativa da) *fitness* global das populações, avaliando o efeito do tamanho populacional, a influência da consanguinidade e da interacção deriva genética-selecção natural.

As populações de efectivo reduzido em ambiente cativo são muito vulneráveis à estocasticidade da deriva genética: a perda de variabilidade genética e a consanguinidade acabam por tornar-se inevitáveis. Espera-se que, com o decorrer das gerações, aumente a frequência de homozigotas, diminua a de heterozigotas e as populações vão acumulando depressão consanguínea. A troca de material genético, por cruzamento de populações diferentes, levará ao aumento da frequência de indivíduos heterozigóticos, à diminuição da consanguinidade e da depressão consanguínea, resultando em maior *fitness* da descendência híbrida relativamente à parental – fenómeno conhecido por heterose (Frankham *et al.*, 2002).

A análise de populações híbridas – resultantes de cruzamentos entre populações diferentes – é uma abordagem essencial em domesticação, pela sua extensibilidade à problemática da fragmentação de populações. Vários autores sugerem que esta é a melhor

estratégia de gestão de populações *ex-situ*, em especial, quando o objectivo é a reintrodução no ambiente natural, já que minimiza o efeito dos factores de deterioração genética inerentes ao ambiente cativo (ver Margan *et al.*, 1998, Frankham, 2005b, 2008). Uma metapopulação formada por várias pequenas subpopulações panmícticas (com troca esporádica de material genético) reterá maior variabilidade genética, terá menor consanguinidade (e depressão consanguínea) e menor adaptação ao cativeiro do que apenas uma população de efectivo elevado (Margan *et al.*, 1998, Woodworth *et al.*, 2002; Frankham, 2005b).

“The physiological vigor of an organism as manifested in its rapidity of growth, its height and general robustness, is positively correlated with the degree of dissimilarity in the gametes by whose union the organism was formed...”

George H. Shull in *What is Heterosis*

Com esta parte do projecto pretende, então, comparar-se populações em diferentes regimes de efectivo e tempos de permanência em laboratório, para avaliar o efeito da consanguinidade na *fitness* e na dinâmica adaptativa das populações.

Para as populações de efectivo reduzido, as expectativas são de diminuição da *fitness* (por depressão consanguínea), redução na resposta evolutiva (por diminuição da variabilidade genética) e um aumento da heterogeneidade entre populações-réplica (pela estocasticidade da deriva genética). Nos regimes mais recentemente introduzidos em laboratório, prevê-se uma menor taxa evolutiva nas populações de efectivo reduzido ou mesmo a ausência de padrão evolutivo, pela anulação recíproca dos efeitos da deriva genética e selecção natural. Pelo mesmo motivo, nos regimes há mais tempo no ambiente laboratorial, a expectativa é de declínio do desempenho das populações mais pequenas.

Espera-se, ainda, que as populações híbridas apresentem maior *fitness* do que as parentais, por diminuição da consanguinidade e aumento do nível de heterozigotia.

2.2. Materiais e Métodos

Fundação e manutenção das populações laboratoriais

Semelhante à descrita anteriormente (ver capítulo 1.2).

Ensaio de fitness

Foram sujeitas a ensaio os regimes PW, IC, XW, NW e NB. O número de gerações em regime *small-size* e o tempo de permanência em laboratório das populações no momento dos ensaios estão indicados na **tabela 2.2.1**.

Através de anestesia com CO₂ foram separados dois conjuntos de 20 machos e 20 fêmeas de cada população (entre 10 e 14 dias de idade – próxima da idade de reprodução dos adultos nas populações), sendo colocados em dois tubos com meio de cultura (igual ao de manutenção); após 24 horas foram transferidos para meio fresco e procedeu-se à substituição dos indivíduos mortos. Foi feita a recolha de todos os ovos da postura de 24 horas, distribuindo-os numa densidade de 60 ± 5 ovos por tubo. O desenvolvimento ocorreu nas mesmas condições de manutenção das populações. Ao fim de 18 dias de desenvolvimento foram recolhidas as emergências ao longo de 4 dias e determinado o número de machos e fêmeas de cada população emergidos em cada dia.

Ensaio de fitness de híbridos de populações-réplica

Foram ensaiadas as réplicas 1 e 3 dos regimes PW, IC, XW, NW e oito populações híbridas resultantes de cruzamentos dentro dos regimes, nas duas direcções parentais. A nomenclatura das populações híbridas teve como base a proveniência das linhas parentais, a primeira parcela referindo a proveniência da linha materna e a segunda a da linha paterna (*e.g.* PW₁PW₃: população formada por fêmeas PW₁ e machos PW₃). Assim, foram sujeitas a ensaio as populações PW₁, PW₃, IC₁, IC₃, XW₁, XW₃, NW₁, NW₃, PW₁PW₃, PW₃PW₁, IC₁IC₃, IC₃IC₁, XW₁XW₃, XW₃XW₁, NW₁NW₃ e NW₃NW₁. O número de gerações em regime *small-size* e o tempo de permanência em laboratório das populações no momento do ensaio estão indicados na **tabela 2.2.2**.

As populações híbridas foram formadas do seguinte modo: ao longo de 4 dias de emergência, através de anestesia de CO₂, foram separados fêmeas e machos virgens de cada população-réplica (a virgindade das moscas foi assegurada pela separação de sexos até 6 horas após a emergência) e colocados em tubos com meio de cultura (igual ao de manutenção) em

grupos de 20 moscas. Ao fim de 24 horas foram formadas as populações a ensaiar: as parentais com machos e fêmeas da mesma população-réplica e as híbridas com machos e fêmeas de réplicas diferentes, de acordo com o supracitado.

Todas as populações foram transferidas para meio fresco de 2 em 2 dias e, ao fim de 7 dias, procedeu-se à substituição dos indivíduos mortos. Foi feita a recolha de todos os ovos da postura de 24 horas, distribuindo-os numa densidade de 60 ± 5 ovos por tubo. O desenvolvimento ocorreu nas mesmas condições de manutenção das populações. Ao fim de 4 dias de emergências, as moscas foram misturadas e foram recolhidas duas amostras de 20 machos e 20 fêmeas de cada população (parental e as duas direcções híbridas F_1), com auxílio de anestesia de CO_2 . Ao fim de 7 dias procedeu-se à substituição dos indivíduos mortos. Foi feita a recolha de todos os ovos da postura de 24 horas, distribuindo-os numa densidade de 60 ± 5 ovos por tubo. A *fitness* das populações foi avaliada através do número de descendentes emergidos ao longo de 4 dias.

Foram ensaiados os seguintes parâmetros:

- **Machos** – número de machos emergidos ao longo dos 4 dias (ensaio de *fitness*);
- **Fêmeas** – número de fêmeas emergidas ao longo dos 4 dias (ensaio de *fitness*);
- **Prole** – somatório do número de machos e fêmeas emergidos ao longo dos 4 dias (ensaios de *fitness* e *fitness* de híbridos de populações-réplica).

Tabela 2.2.1 – Ensaios de *fitness*: tempo de permanência em laboratório e em regime de efectivo reduzido (*small-size*).

ENSAIO	TEMPO (GERAÇÕES)	PW	IC	XW	NW	NB
G5	Laboratório	8	124	8	124	214
	Regime <i>small-size</i>	5		*****	*****	*****
G9	Laboratório	12	128	12	128	218
	Regime <i>small-size</i>	9		*****	*****	*****
G13	Laboratório	16	132	16	132	222
	Regime <i>small-size</i>	12		*****	*****	*****

Tabela 2.2.2 – Ensaio de *fitness* de híbridos de populações-réplica: tempo de permanência em laboratório e em regime de efectivo reduzido (*small-size*).

ENSAIO	TEMPO (GERAÇÕES)	PW	IC	XW	NW
G5	Laboratório	15	131	15	131
	Regime <i>small-size</i>	12		*****	*****

Análise estatística

Para a análise dos dados foram utilizados os programas informáticos MICROSOFT EXCEL® 2003 e STATSOFT STATISTICA® 8.0. As hipóteses nulas (adiante designadas por H_0) foram testadas a um nível de significância de 5% ($\alpha = 0.05$).

Paralelamente ao realizado para as características da história da vida (*capítulo 1.2*), optou-se pela utilização dos valores relativos à população-controlo ($\text{regime}_x - \text{NB}_x$) em todas as variáveis analisadas: MACHOS, FÊMEAS e PROLE.

Em primeiro lugar, analisou-se o efeito do tempo de permanência em laboratório e do tamanho da população, em cada um dos ensaios (G5, G9 e G13), na *fitness* das populações. Para tal, aplicou-se a cada ensaio uma ANOVA BIFACTORAL, segundo a expressão:

$$Y = \mu + LT + PS + LT*PS + \varepsilon$$

em que Tempo em Laboratório (LT) e Tamanho da População (PS) são factores fixos. O factor LT tem duas categorias (ST – SHORT-TERM e LT – LONG-TERM) assim como o factor PS (SMALL e LARGE).

Para avaliar as alterações da *fitness* ao longo das gerações (G), aplicou-se ao conjunto dos dados uma ANOVA TRIFACTORAL, segundo a expressão:

$$Y = \mu + LT + PS + G + LT*PS + LT*G + PS*G + LT*PS*G + \varepsilon$$

em que LT, PS e G são factores fixos e o factor G tem três categorias – 5, 9 e 13.

Com o objectivo de verificar a existência de diferenças significativas entre as populações ao longo das gerações, tendo em conta o efeito do número de gerações na análise de variância e para testar a existência de alterações na dinâmica evolutiva, foi realizada uma análise de covariância (ANCOVA) com a geração a funcionar como covariável, segundo o modelo:

$$Y = \mu + LT + PS + G + LT*PS + LT*G + PS*G + LT*PS*G + \varepsilon$$

Visando analisar a dinâmica evolutiva das populações, traçaram-se as trajectórias evolutivas para o número total de descendentes (PROLE). Recorreu-se à regressão linear simples, utilizando o valor da diferença ao controlo das características para cada população-réplica como variável dependente e o número de gerações ensaiadas como variável independente. A significância das trajectórias foi determinada através do seguinte modelo ANCOVA:

$$Y = \mu + \text{Réplica} + G + \text{Réplica}*G + \varepsilon$$

em que G é a covariável e RÉPLICA é factor aleatório.

Para avaliar o efeito da deriva genética na variância das populações, testou-se a homogeneidade entre as populações-réplica, comparando os regimes *small-size* com *large-size* (em cada geração); utilizaram-se os valores da diferença ao controlo para cada característica e aplicou-se o teste de Brown-Forsythe.

Analogamente ao realizado no capítulo anterior, compararam-se os valores teoricamente previstos da razão das respostas à selecção (adaptação genética) entre populações com diferentes efectivos populacionais com os valores observados nas mesmas populações. Os valores esperados da resposta à selecção foram calculados através da seguinte relação (ver demonstração no capítulo 1.2):

$$\frac{R_t(PW)}{R_t(XW)} = \frac{\sum [1 - 1 / (2N_e)]^{t-1}_{(PW)}}{\sum [1 - 1 / (2N_e)]^{t-1}_{(XW)}}$$

Foi novamente utilizada a relação $N_e = 0.25 N$, estimada por Simões *et al.*, 2008b. Os valores observados foram calculados através da equação de regressão de cada regime para o número total de descendentes (resultante da análise previamente realizada).

Para estimar a magnitude da depressão consanguínea (e a sua diminuição por “*outcross*”) na *fitness* das populações laboratoriais, aplicou-se uma ANOVA TRIFACTORIAL aos dados do ensaio de híbridos entre populações-réplica, segundo a expressão:

$$Y = \mu + LT + PS + CT + LT*PS + LT*CT + PS*CT + LT*PS*CT + \varepsilon$$

em que LT, PS e CT (CROSS-TYPE) são factores fixos e o factor CT tem duas categorias – PARENTAL (duas populações parentais, não discriminadas, *e.g.* PW1 e PW3) e HYBRID (duas direcções, não discriminadas, *e.g.* PW₁PW₃ e PW₃PW₁).

Os pressupostos das análises realizadas foram verificados através dos testes de Shapiro-Wilk e Brown-Forsythe. Pelas razões referidas anteriormente, foram aceites pequenos desvios à normalidade.

2.3. Resultados

A ANOVA aplicada a cada geração ensaiada revelou a existência de diferenças significativas entre as populações com tempos de permanência em laboratório distintos (*factor LT*), com excepção do ensaio da geração 13. Não se registaram diferenças no regime de tamanho populacional (*factor PS*) ou na interacção entre os dois factores (*LT*PS*) em nenhuma das variáveis em estudo (**tabela 2.3.1**).

A análise à variação da *fitness* ao longo das gerações (**tabela 2.3.2**) indicou alterações temporais significativas (*factor G*) nas três variáveis consideradas, mantendo-se consistente a influência do tempo em laboratório (menor *fitness* dos regimes *short-term* – PW e XW – relativamente aos *long-term* – IC e NW – em ambos os regimes de efectivo populacional). Os resultados obtidos através da análise de covariância (**tabela 2.3.3**) revelaram efeitos significativos da covariável no número de machos e no total de descendentes, não se registando diferenças entre regimes de tempo em laboratório, de efectivo populacional ou interacção entre estes. Os valores médios do número de descendentes (machos, fêmeas e prole) estão graficamente representados nas **figuras 2.3.1-3**.

Tabela 2.3.1 – Valores de *p* da ANOVA BIFACTORIAL aplicada a cada um dos ensaios (G5, G9 e G13) para cada uma das variáveis. Os valores assinalados a vermelho indicam $p < 0.05$.

		Machos	Fêmeas	Prole
Ensaio G5	LT	0.000973	0.007901	0.002615
	PS	0.259049	0.742267	0.494792
	LT*PS	0.166046	0.893627	0.494792
Ensaio G9	LT	0.022320	0.043808	0.029379
	PS	0.847050	0.591271	0.870269
	LT*PS	0.964456	0.774697	0.907094
Ensaio G13	LT	0.107114	0.141480	0.121314
	PS	0.685326	0.800259	0.741355
	LT*PS	0.763370	0.807349	0.784251

Tabela 2.3.2 – Valores de *p* da ANOVA TRIFACTORIAL aplicada às três características estudadas. Os valores assinalados a vermelho indicam $p < 0.05$.

	Machos	Fêmeas	Prole
G	2.95.10 ⁻⁷	6.32.10 ⁻⁸	8.69.10 ⁻⁸
LT	0.000025	0.000207	0.000057
PS	0.690786	0.816177	0.946852
G*LT	0.402501	0.325480	0.354426
G*PS	0.611526	0.820269	0.747132
LT*PS	0.610055	0.829240	0.896349
G*LT*PS	0.537351	0.945744	0.773007

Tabela 2.3.3 – Valores de *p* da ANCOVA aplicada às três características estudadas. Os valores assinalados a vermelho indicam $p < 0.05$.

	Machos	Fêmeas	Prole
G	0,030958	0,060068	0,043229
LT	0.064380	0.110327	0.084599
PS	0.503663	0.845989	0.680404
G*LT	0.395467	0.407495	0.398257
G*PS	0.534467	0.798537	0.671657
LT*PS	0.458127	0.910828	0.689121
G*LT*PS	0.500467	0.869510	0.690876

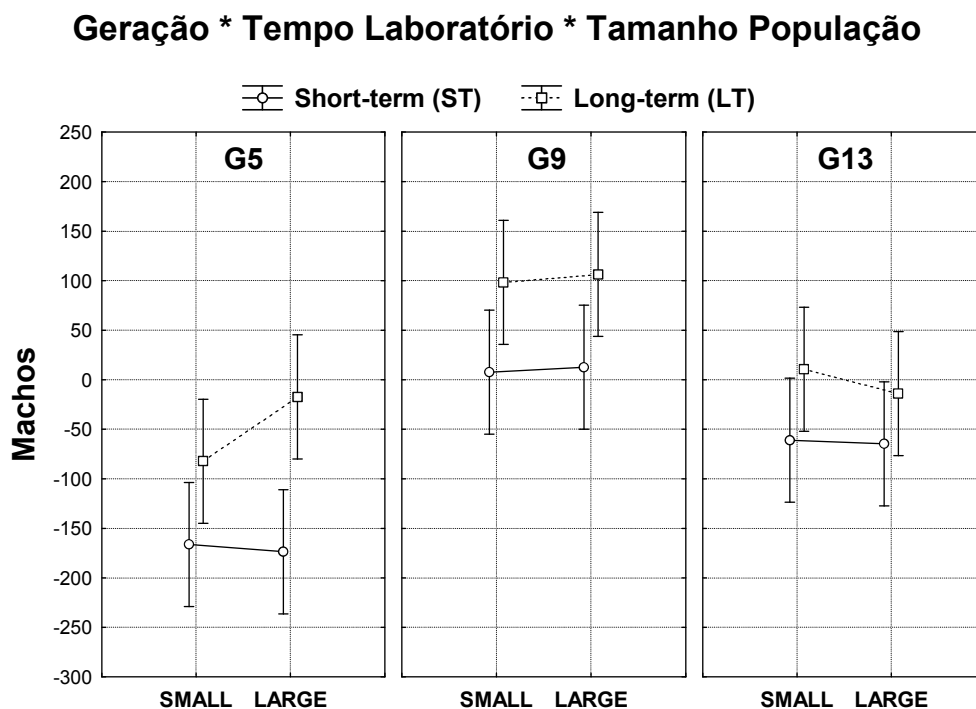


Figura 2.3.1 – Valores médios do número de machos descendentes (dados da diferença ao controle). As barras de erro correspondem aos intervalos de confiança a 95%, calculados com base no residuo do termo de interacção (acima definido) da ANOVA TRIFACTORIAL.

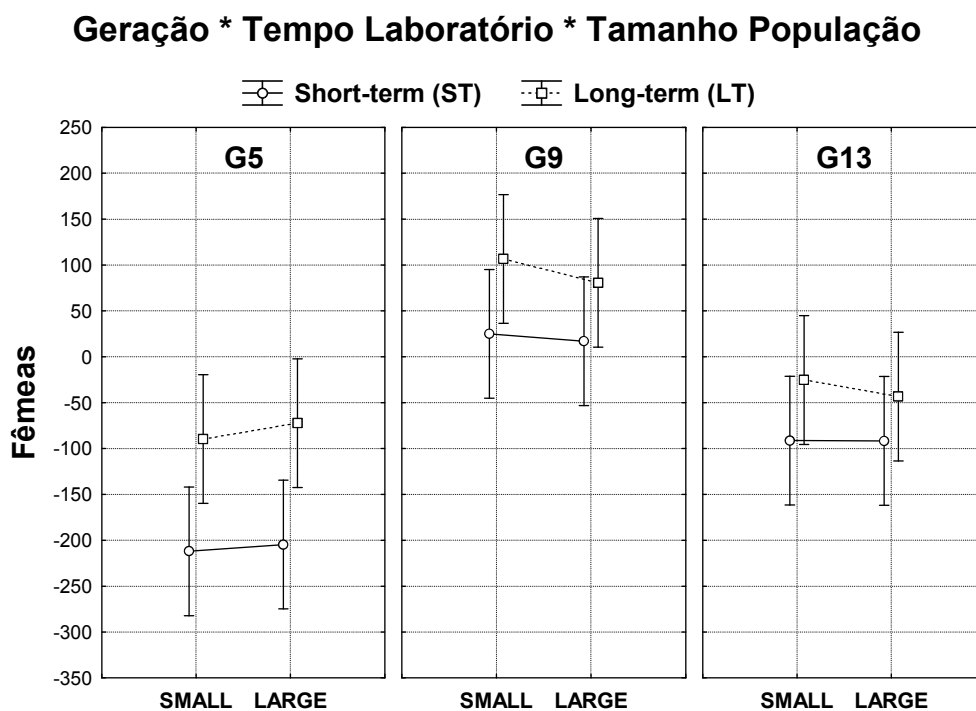


Figura 2.3.2 – Valores médios do número de fêmeas descendentes (dados da diferença ao controle). As barras de erro correspondem aos intervalos de confiança a 95%, calculados com base no residuo do termo de interacção (acima definido) da ANOVA TRIFACTORIAL.

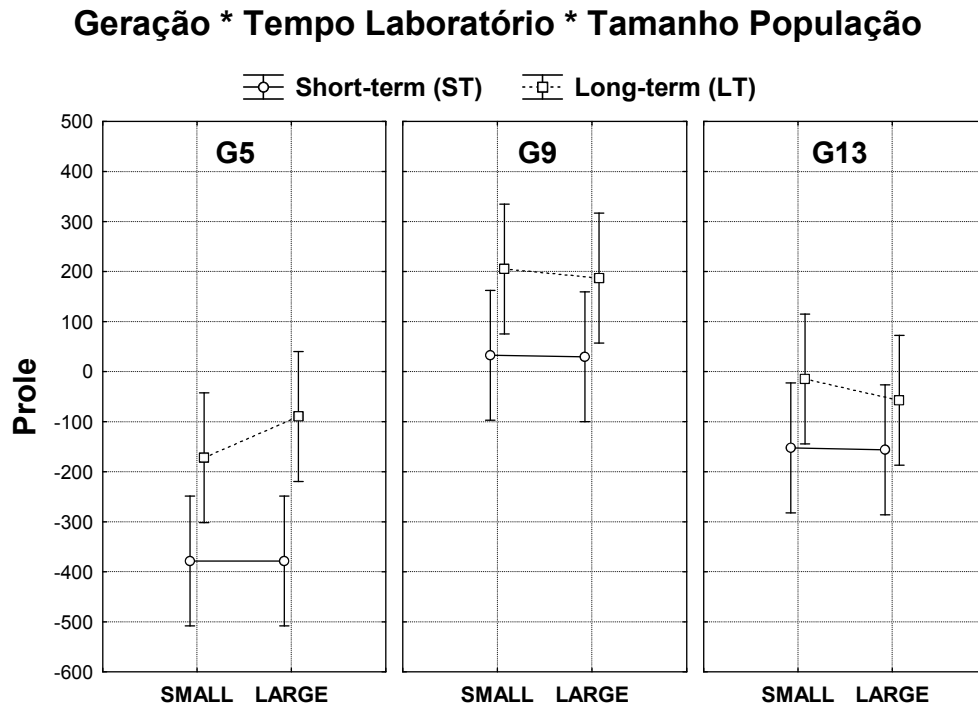


Figura 2.3.3 – Valores médios do número total de descendentes (dados da diferença ao controlo). As barras de erro correspondem aos intervalos de confiança a 95%, calculados com base no resíduo do termo de interacção (acima definido) da ANOVA TRIFACTORIAL.

As trajectórias evolutivas traçadas para a *fitness* (**figura 2.2.4a-d**) deram resultados semelhantes aos da fecundidade precoce (*capítulo 1.3*). Ambos os regimes *short-term* revelaram diferenciação inicial significativa; o regime PW indicou alterações ao longo das gerações ($p < 0.01$) e o regime XW revelou alterações com significância estatística marginal ($p = 0.08$). Os regimes *long-term* (IC e NW) não apresentaram quaisquer diferenças significativas.

O teste de Brown-Forsythe à homogeneidade entre réplicas em cada geração não mostrou diferenças significativas entre regimes *small-size* e *large-size* ($p > 0.05$). Porém, os resultados dos regimes *long-term* são na direcção esperada – aumento da heterogeneidade entre populações-réplicas (**figura 2.3.4c e d**).

Nos regimes *short-term*, a razão entre a resposta à selecção ao fim de 13 gerações prevista pelo modelo aditivo foi **0.804** e, nos regimes *long-term*, **0.802** – espera-se, então, uma diminuição de cerca de 20% na resposta das populações de efectivo reduzido. Os valores obtidos foram superiores ao esperado, sendo de **1.018** para os regimes *short-term* e **4.866** para os *long-term*.

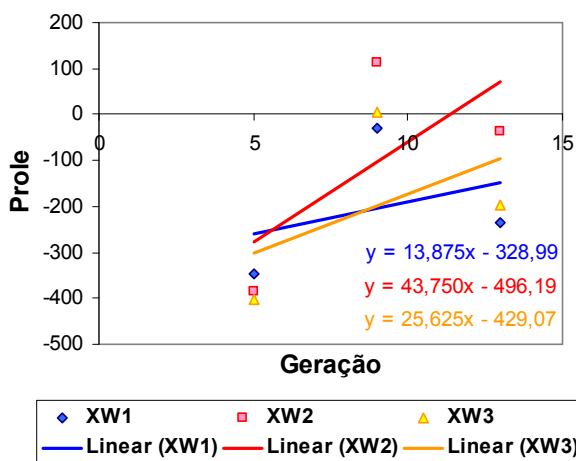


Figura 2.3.4a

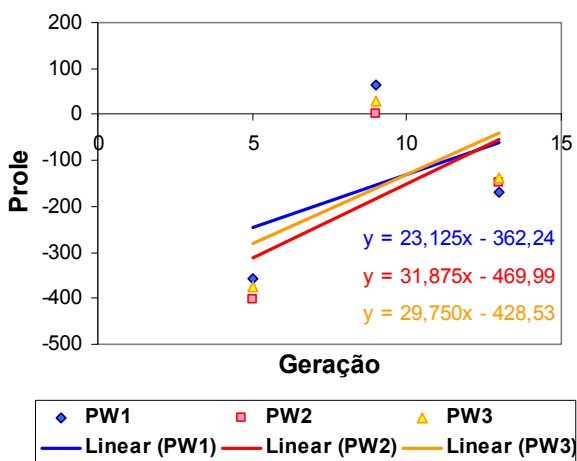


Figura 2.3.4b

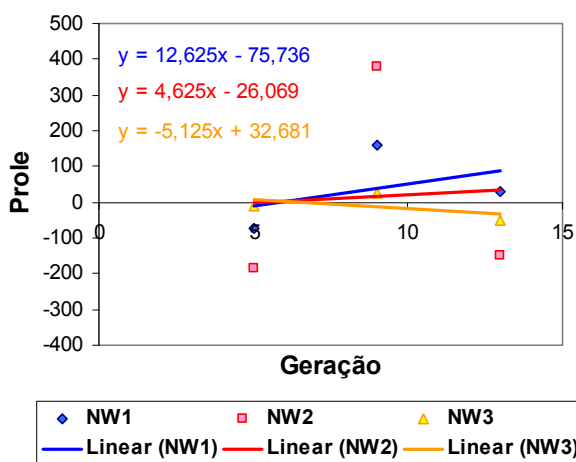


Figura 2.3.4c

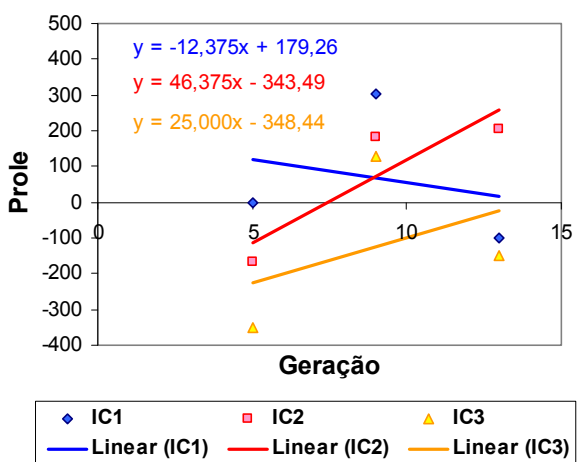


Figura 2.3.4d

Figura 2.3.4 – Trajectórias evolutivas para o número total de descendentes. Os dados utilizados correspondem à diferença dos valores entre cada réplica e a respectiva réplica-controlo, em cada geração: a) Regime XW; b) Regime PW; c) Regime NW; d) Regime IC.

A análise aplicada ao ensaio de *fitness* de híbridos apontou diferenças significativas entre populações com diferentes tempos de permanência em laboratório (*factor LT* com $p < 0.001$) e entre populações com diferentes efectivos (*factor PS* com $p < 0.05$). Não se observaram diferenças significativas no tipo de cruzamento (parentais vs. híbridos), quer no conjunto dos dados, quer em contrastes para cada par de populações-réplica. Os valores médios de número de descendentes estão representados na **figura 2.3.5**.

Tempo Laboratório * Tamanho População * Cruzamento

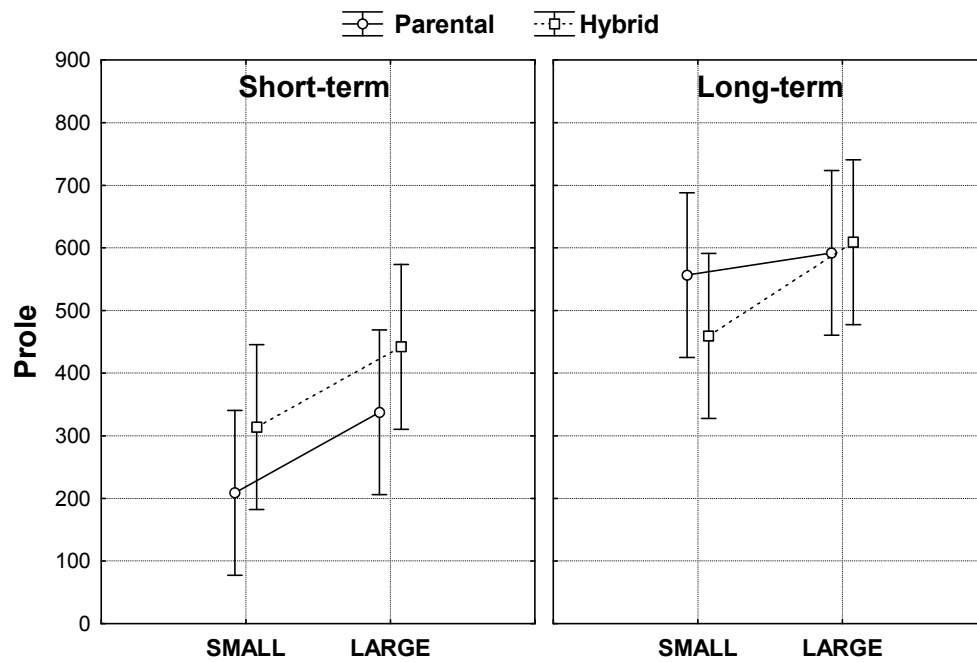


Figura 2.3.5 – Valores médios do número total de descendentes das populações parentais e híbridas. As barras de erro correspondem aos intervalos de confiança a 95%, calculados com base no resíduo do termo de interação acima definido.

2.4. Discussão

Dados da fitness corroboram os das características individuais

Os resultados obtidos nesta parte do projecto foram consistentes com os observados, quer nos estudos anteriores (Gilligan & Frankham, 2003; Matos *et al.*, 2002, 2004; Simões *et al.*, 2007, 2008a), quer na abordagem às características da história da vida do capítulo 1: as populações há mais tempo em laboratório mostraram uma tendência geral para maior *fitness* e menor taxa evolutiva do que as populações mais recentemente introduzidas. No entanto, não ocorreram diferenças significativas, muito provavelmente devido à elevada heterogeneidade entre as populações-réplica sobretudo nos regimes de pequeno efectivo.

Como referido anteriormente, a acção da deriva genética favorece a diminuição da variabilidade global das populações, podendo levar à divergência entre populações sujeitas ao mesmo regime selectivo (Frankham *et al.*, 2002; Woodworth *et al.*, 2002; Frankham, 2005b). Novamente, não obstante o teste de Brown-Forsythe não devolver diferenças significativas, observou-se um aumento da heterogeneidade entre as populações-réplica no regime *small-size* em relação ao *large-size*, nas populações há mais tempo em laboratório. A ausência de significado nas diferenças observadas neste parâmetro de heterogeneidade pode ter resultado do enorme erro associado às estimativas de variância e pelo facto de apenas ter sido ensaiado um reduzido número de gerações.

Efectivo populacional – it seems that size could matter...

Segundo as expectativas teóricas, quanto menor for o tamanho de uma população, maior será a sua consanguinidade e mais severa a perda de variabilidade genética por estocasticidade; espera-se, então, que uma população mais pequena apresente menor *fitness*, menor potencial evolutivo e menor resposta à selecção (Frankham *et al.*, 2002).

No presente trabalho foram encontradas diferenças significativas de *fitness* entre os dois regimes de efectivo populacional, apenas no ensaio da geração 12, sendo no sentido esperado, ou seja, maior *fitness* das populações grandes (**figura 2.3.5**). No entanto, os restantes ensaios não deram diferenças significativas, nem uma sugestão consistente de menor desempenho das populações pequenas (**figura 2.3.3**). Apesar de ambos os regimes *short-term* (PW e XW) apresentarem maior taxa evolutiva do que os *long-term*, os dados da *fitness* não mostraram um abrandamento na dinâmica evolutiva nas populações pequenas (como sucedido nas

características da história da vida); estas observações dever-se-ão provavelmente ao menor número de gerações ensaiadas (**figura 2.3.4a-d**).

A resposta à selecção de uma população depende do seu potencial evolutivo: quanto maior for o tempo de permanência em laboratório (maior estado de adaptação ao ambiente) e menor o efectivo populacional (maior perda de variabilidade genética), menor se espera que seja a resposta evolutiva. Segundo o modelo teórico aditivo de Frankham & Kingslover (2004), as populações *small-size* deveriam sofrer uma redução de aproximadamente 20% na resposta evolutiva em relação às respectivas *large-size*. Os dados obtidos nos ensaios de *fitness* contrariam totalmente esta expectativa: as populações em regime de efectivo reduzido mostraram maior resposta à selecção do que as de efectivo elevado. Estes resultados poderão sugerir uma maior estabilidade da matriz de variâncias e covariâncias nas populações de pequena dimensão, eventualmente por contribuição de efeitos de dominância e epistasia (variância genética não-aditiva) (Frankham *et al.*, 2002).

Populações híbridas e depressão consanguínea

Quando são cruzadas populações consanguíneas, espera-se que ocorra um aumento da frequência de indivíduos heterozigóticos, uma redução na consanguinidade e, consequentemente, uma diminuição da depressão consanguínea – a descendência híbrida terá maior *fitness* que a parental (heterose) (Frankham *et al.*, 2002). Esta expectativa não foi confirmada no ensaio de *fitness* de híbridos de populações-réplica: apesar de nos regimes *short-term* os híbridos terem demonstrado uma performance ligeiramente superior à dos parentais, não se observaram diferenças estatisticamente significativas. Tal pode dever-se apenas ao facto das populações estarem há poucas gerações em regimes de efectivo diferentes, não tendo decorrido o tempo suficiente para a depressão consanguínea se manifestar de forma significativa.

A análise de estimativas da *fitness* é uma abordagem muito importante, tanto em estudos evolutivos, como na problemática da conservação *ex-situ*. Permite uma visualização geral do panorama genético e estado adaptativo das populações mantidas em ambiente cativo, essenciais à elaboração de bons programas de gestão em cativeiro. Reforça-se a necessidade da realização de mais estudos envolvendo maior replicação e abrangência de gerações, na medida em que permitirão clarificar as questões abordadas no presente trabalho.

Capítulo 3.

Comportamento de Acasalamento

3.1. Introdução

O comportamento de acasalamento é um fenómeno complexo e bastante comum na ordem *Diptera*, tendo vindo a ser estudado desde o início do século XX. Em 1915, Sturtevant estudou pormenorizadamente o comportamento de *Drosophila melanogaster* e apresentou, em 1921, descrições deste comportamento em 22 espécies (Spieth, 1952). Este organismo tornou-se, então, o centro de várias análises etológicas e estudos evolutivos, tendo sido muito utilizado como modelo no estudo da arquitectura genética de características comportamentais (Moehring *et al*, 2004).

No género *Drosophila*, o comportamento de acasalamento consiste num conjunto de padrões fixos de acção espécie-específicos, acompanhados por movimentos de orientação; estes padrões (rituais de acasalamento) são compostos por um conjunto de elementos (ou sinais) executados sequencialmente. O macho inicia a corte realizando um padrão fixo de acção direccionado a um indivíduo cuja forma e dimensão indicam um potencial parceiro sexual; a resposta deste resulta numa troca de informação que permite aos indivíduos distinguir conspecíficos de não-conspecíficos, machos de fêmeas e também o estado fisiológico da fêmea para a cópula. Se o indivíduo for uma fêmea conspecífica virgem, o macho insiste no ritual até ao sucesso da cópula ou um deles terminar o encontro (Spieth & Ringo, 1983).

Em *Drosophila subobscura*, este comportamento foi extensamente descrito por vários autores, tendo sido sumariado por Steele (1986a). Quando um macho encontra uma fêmea receptiva, aproxima-se dela lateralmente (fase de orientação da corte) e toca-lhe ritmadamente com as patas dianteiras, podendo também oscilar ligeiramente as asas ou rodar as patas do meio; a fêmea começa, então, a fazer movimentos rápidos laterais e o macho tenta manter uma posição frontal (fase da dança). Durante a “dança nupcial” ou no momento em que a fêmea pára de movimentar-se, o macho executa o chamado “wing display”, elevando ambas as asas acima do corpo, em forma de “V”. Nesta fase, a fêmea normalmente estende o probóscis em direcção ao probóscis do macho e este poderá passar-lhe uma gotícula de alimento; em seguida, o macho move-se muito rapidamente para a zona posterior da fêmea e tenta a cópula. Esta sequência pode ser interrompida a qualquer momento por rejeição da fêmea (“decamp”): ela pode afastar-se, voar para longe, extrudir o ovipositor ou dobrar o abdómen.

Vários estudos têm sido feitos em *Drosophila* de modo a caracterizar os diferentes tipos de comportamento e a sua determinação genética (Maynard Smith, 1956; Singh & Singh, 2003; Mackay *et al.*, 2005; Mueller *et al.*, 2005; Edwards *et al.*, 2006). No entanto, existem relativamente poucos estudos que caracterizem a evolução do comportamento durante a adaptação a um novo ambiente (Grant & Mettler, 1969; Steele, 1986a, 1986b; Sokolowski *et al.*, 1997; Huey *et al.*, 2003; Mueller *et al.*, 2005).

O comportamento de acasalamento em *Drosophila* é um importante componente da *fitness* e apresenta variabilidade nas populações naturais (Moehring & Mackay, 2004). Esta característica poderá ter um impacto relevante no desempenho das populações, quando os indivíduos são introduzidos num novo ambiente (devido a alterações de, por exemplo, densidade, espaço, luz, disponibilidade de nutrientes, etc.). Pensa-se que o comportamento de acasalamento, devido à sua importância para a reprodução, sofre uma forte pressão selectiva (Futuyma, 1998).

Como consequência do “Teorema Fundamental da Selecção Natural” de Fisher, as características relacionadas com a *fitness* deverão exibir reduzida variância genética aditiva mas estar altamente dependentes da depressão consanguínea (Sharp, 1984). Uma questão bastante abordada mas que continua a gerar alguma controvérsia na comunidade científica é o modo como a escolha de parceiro pela fêmea é influenciada pela consanguinidade. O argumento de que as fêmeas preferem machos *outbred* em detrimento de machos *inbred* pelos primeiros serem mais férteis pensa-se estar errado. Segundo Maynard Smith (1956), o baixo sucesso de acasalamento dos machos *inbred* deve-se principalmente a uma reduzida capacidade atlética e não a limitações no impulso sexual: “*The spirit is willing but the flesh is weak...*” (Joshi, 2005). Existem cada vez mais estudos que contrariam a ideia de que a fêmea tenderá a escolher um macho que potencie a sua *fitness*, mas que a escolha da fêmea terá como base um conflito sexual e que o acasalamento com os machos potencialmente “melhores” poderá ser prejudicial para a sua *fitness* – “*chase-away sexual selection*” (e.g. Holland & Rice, 1998, 1999; Friberg & Arnqvist, 2003; Gavrillets *et al.*, 2001).

Uma outra razão apontada para a diminuição do sucesso de acasalamento dos machos *inbred* é a variabilidade existente nas feromonas voláteis produzidas por ambos os sexos e necessárias à normal iniciação da corte. Os trabalhos de Averhoff & Richardson (1974, 1976) sugerem que as fêmeas respondem menos a feromonas de machos da mesma linha do que a feromonas derivadas de outros genótipos. Assim, os machos *inbred* estarão em desvantagem quando em competição com machos *outbred* por uma fêmea *inbred* do mesmo *stock*.

Esta parte do projecto tem como propósito testar as diferenças em diversos parâmetros do comportamento de acasalamento entre populações em diferentes regimes de efectivo populacional e de tempo em laboratório, de modo a avaliar o efeito da consanguinidade e da interacção deriva genética-selecção natural neste comportamento. Espera-se, à partida, um melhor desempenho das populações em regime *large-size* relativamente às *small-size*, bem como daquelas há mais tempo em laboratório comparativamente com as mais recentes: corte mais breve, cópula mais longa e melhor performance em competição pelo acasalamento.

3.2. Materiais e Métodos

Fundação e manutenção das populações laboratoriais

Semelhante à descrita anteriormente (ver capítulo 1.2).

Ensaio de comportamento de acasalamento

Foram sujeitas a ensaio as populações PW, IC, XW e NW; o número de gerações em regime *small-size* e o tempo de permanência em laboratório de cada população no momento do ensaio estão indicados na **tabela 3.2.1**. Foram realizados dois tipos de ensaio: casais homogâmicos vs. heterogâmicos e competição de machos; para ambos, foram separados machos e fêmeas no dia de emergência recorrendo a anestesia com CO₂, sendo as moscas mantidas individualmente durante um período de 7/8 dias, findo o qual foram realizados os ensaios.

Casais homogâmicos vs. heterogâmicos

Foram formados casais homogâmicos (macho e fêmea da mesma população) e heterogâmicos (macho e fêmea de populações diferentes) das populações *small-size* e respectiva *large-size* da qual derivou (e.g. ♀PW₁♂PW₁, ♀XW₁♂XW₁, ♀PW₁♂XW₁ e ♀XW₁♂PW₁); procedeu-se à observação de 10 casais de cada tipo (num total de 240), em blocos de 8 casais distribuídos aleatoriamente. O estudo consistiu na observação, ao longo de um período pré-determinado (1 hora) e cronometragem de 4 parâmetros do comportamento de acasalamento: latência de corte – LC, duração da corte – DC, latência do acasalamento – LK e duração da cópula – DK.

Competição de machos

Foram colocados dois machos (um de cada população a ensaiar, e.g. ♂PW₁ vs. ♂XW₁) num tubo com uma fêmea de uma das populações (e.g. PW₁), sendo registados os acasalamentos ocorridos durante 1 hora. Como os machos das populações são morfologicamente iguais, para serem distinguidos foram previamente marcados com corante de entomólogo (azul ou vermelho). Devido a limitações no material biológico, apenas foram ensaiadas as réplicas 2 e 3 de cada regime. Foram postos em competição os machos das populações *small-size* e respectiva *large-*

size pelo acasalamento com a fêmea de uma das populações (repetindo-se o ensaio utilizando a outra fêmea); realizaram-se 10 ensaios envolvendo cada tipo de combinação de machos, fêmea e cores, num total de 160 ensaios.

Tabela 3.2.1 – Ensaio de comportamento de acasalamento: tempo de permanência em laboratório e em regime de efectivo reduzido (*small-size*).

ENSAIO	TEMPO (GERAÇÕES)	PW	IC	XW	NW
G13	Laboratório	16	132	16	132
	Regime <i>small-size</i>	13		*****	*****

Análise estatística

Para a análise dos dados foram utilizados os programas informáticos MICROSOFT EXCEL® 2003 e STATSOFT STATISTICA® 8.0. As hipóteses nulas (adiante designadas por H_0) foram testadas a um nível de significância de 5% ($p < 0.05$).

A primeira abordagem deste estudo incidiu sobre o efeito do efectivo populacional nos 4 parâmetros do comportamento de acasalamento (LC, DC, LK e DK). Para tal, aplicou-se separadamente aos regimes *short-term* e *long-term* e a cada parâmetro uma ANOVA TRIFACTORAL MISTA, segundo a expressão:

$$Y = \mu + \text{♀} + \text{♂} + B + \text{♀} * \text{♂} + \text{♀} * B + \text{♂} * B + \text{♀} * \text{♂} * B + \varepsilon$$

em que Tipo de Fêmea (♀) e Tipo de Macho (♂) são factores fixos e Bloco (B) é factor aleatório. Os factores ♀ e ♂ têm duas categorias (SMALL e LARGE).

Para avaliar as diferenças entre os casais homo e heterogâmicos nos regimes *small-size* e nos regimes *large-size* (ou seja, o efeito do tipo de fêmea no desempenho de cada tipo de macho) fez-se uma análise de contrastes ortogonais (*e.g.* ♀PW♂PW vs ♀XW♂PW).

Na medida em que não foram ensaiados casais homo e heterogâmicos de populações há mais e menos tempo em laboratório, o efeito do tempo de permanência em laboratório foi testado separadamente para machos e fêmeas. Foi aplicada aos parâmetros do comportamento de acasalamento uma ANOVA TETRAFACTORAL MISTA, segundo a expressão:

$$Y = \mu + LT + mPS + CT + B + LT * mPS + LT * CT + LT * B + mPS * CT + mPS * B + CT * B + LT * mPS * CT + LT * mPS * B + PS * CT * B + LT * mPS * B + LT * mPS * CT * B + \varepsilon$$

em que LT (TEMPO EM LABORATÓRIO), mPS (MALE POP SIZE) e CT (CROSS-TYPE) são factores fixos e B é factor aleatório. O factor CT tem duas categorias – HOMOGAMIC e HETEROGAMIC. Aplicou-se o mesmo às fêmeas.

A existência de *outliers* foi detectada através do teste de Grubbs (Grubbs, 1969) e a sua eliminação foi decidida com base nas observações registadas durante a execução dos ensaios. Os pressupostos das análises de variância foram verificados através dos testes de Shapiro-Wilk e Brown-Forsythe. Pelas razões referidas anteriormente (*capítulo 1.2*), foram aceites pequenos desvios à normalidade. As análises da latência de corte (no modelo *long-term*), duração da corte e latência do acasalamento (em ambos os modelos *short-term* e *long-term*) revelaram heterocedasticidade entre as populações em estudo; a homocedasticidade foi alcançada através da aplicação da transformação log-linear (base neperiana): $y = \text{Log } x$, em que $x = LC \vee x = DC \vee x = LK$. Esta transformação foi também aplicada à variável LC no modelo *short-term* para obtenção da **figura 3.3.1a**, de modo a ser graficamente comparável à do modelo *long-term*.

O comportamento de machos em competição foi avaliado através do sucesso de acasalamento, ou seja, da proporção de cópulas (acasalamentos bem sucedidos) no total de acasalamentos. Teoricamente, dois machos em competição têm igual probabilidade de bem sucedidos no acasalamento. Assim, X : “sucesso de acasalamento” é uma variável aleatória com distribuição binomial – $X \cap \text{BINOMIAL}(n, 0.5)$. Na medida em que os dados representam uma proporção, foi aplicada a transformação angular: $y = \arcsen\sqrt{p}$ (Sokal & Rohlf, 1995). Como o acasalamento com o macho de um dado regime impede necessariamente o acasalamento com o macho do outro regime, os testes foram apenas realizados sobre um deles (no presente utilizou-se o correspondente *small-size*). Se conclusões idênticas forem tiradas quando analisado o outro regime, então a variância entre populações é semelhante dentro dos regimes selectivos (Service, 1993).

Para testar o efeito da cor do macho na fêmea, aplicou-se um teste t de *Student* bicaudal a cada tipo de fêmea (e.g. ♂PW_{AZUL} vs. ♂PW_{VERMELHO} em competição por ♀PW). Testou-se, em seguida, o efeito do tipo de fêmea no desempenho do macho também através dum teste t de *Student* bicaudal (e.g. ♀PW vs. ♀XW para ♂PW).

Para avaliar as diferenças entre regimes de dimensão populacional (*small* vs. *large*) aplicou-se um teste t de *Student* à igualdade da média a $\arcsen\sqrt{0.5}$ e, para despistar falsos negativos devido à baixa replicação do ensaio, recorreu-se à distribuição binomial, comparando os valores obtidos aos teoricamente previstos.

Realizou-se, por fim, um teste t de *Student* bicaudal para analisar a performance relativa das populações *large-size* quando em competição com a respectiva *small-size* (♂XW vs. ♂NW) e das populações *small-size* quando em competição com a respectiva *large-size* (♂PW vs. ♂IC).

3.3. Resultados

A análise ao efeito do efectivo populacional nos parâmetros do comportamento de acasalamento em estudo não revelou diferenças nos regimes *short-term* nem nos regimes *long-term*. Não se encontraram diferenças significativas no tipo de macho, no tipo de fêmea ou na interacção dos dois factores em nenhum dos quatro parâmetros analisados (**tabela 3.3.1**). Os contrastes ortogonais mostraram efeitos significativos do tipo de fêmea no desempenho do macho IC ($p < 0.05$) na duração da corte e na latência do acasalamento. Os valores médios para os quatro parâmetros estudados estão graficamente representados na **figura 3.3.1**.

A ANOVA TETRACTORIAL aplicada aos dados de ambos os regimes *short-term* e *long-term* não mostrou diferenças significativas em nenhum dos factores ou termos de interacção relevantes.

Tabela 3.3.1 – Valores de p da ANOVA TRIFACTORIAL MISTA aplicada aos quatro parâmetros do comportamento de acasalamento. **a)** Modelo *short-term* (PW vs. XW); **b)** Modelo *long-term* (IC vs. NW). Os valores assinalados a vermelho indicam $p < 0.05$.

a)	REGIMES <i>SHORT-TERM</i>			
	LC	DC	LK	DK
♀	0.1048	0.1452	0.6915	0.9668
♂	0.3027	0.4226	0.2170	0.2294
B	0.5643	0.9905	0.6849	0.7783
♀*♂	0.2569	0.3235	0.2180	0.0602
♀* B	0.8294	0.4226	0.2527	0.2038
♂* B	0.3358	0.0720	0.1962	0.7445
♀*♂* B	0.5038	0.8241	0.6390	0.6383

b)	REGIMES <i>LONG-TERM</i>			
	LC	DC	LK	DK
♀	0.5928	0.4259	0.3734	0.5852
♂	0.6515	0.7338	0.9208	0.8600
B	0.4559	0.7165	0.4382	0.6459
♀*♂	0.2798	0.3866	0.5242	0.1901
♀* B	0.0644	0.1713	0.1918	0.2410
♂* B	0.1494	0.5103	0.5262	0.0346
♀*♂* B	0.7230	0.4232	0.3618	0.7580

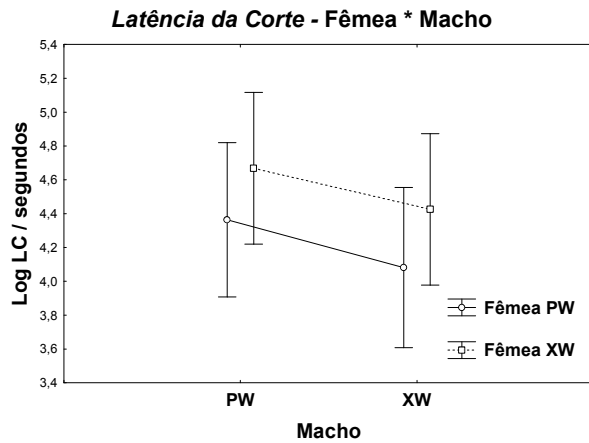


Figura 3.3.1a

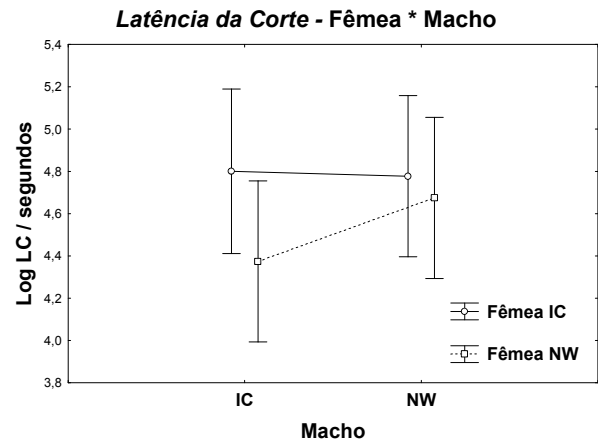


Figura 3.3.1b

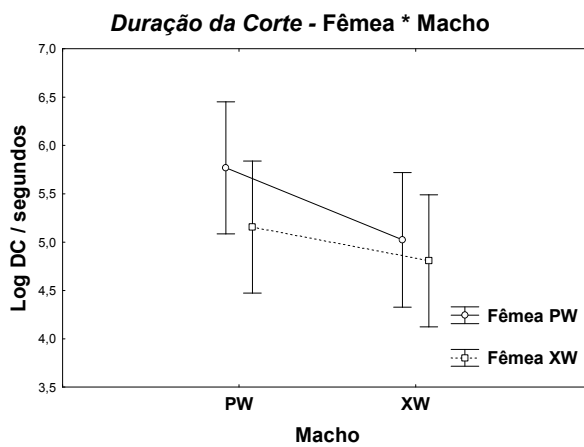


Figura 3.3.1c

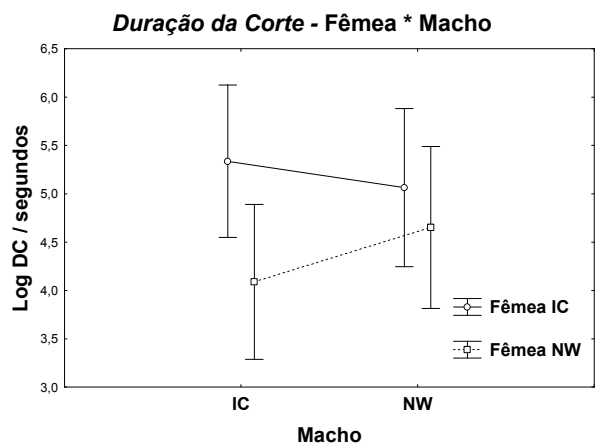


Figura 3.3.1d

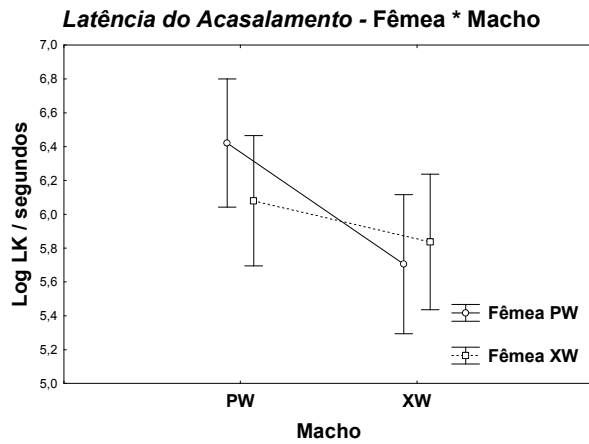


Figura 3.3.1e

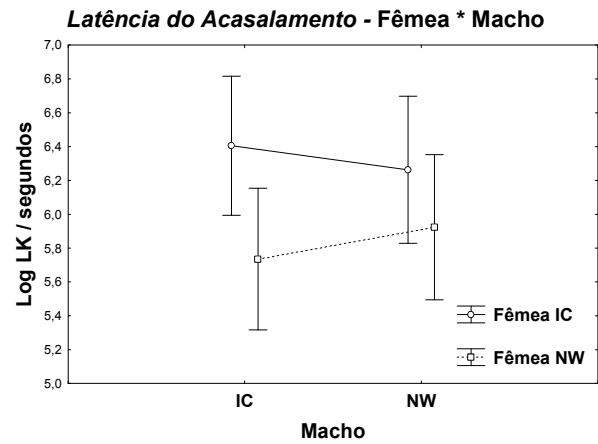


Figura 3.3.1f

Figura 3.3.1 – Valores médios dos parâmetros do comportamento de acasalamento. As barras de erro correspondem aos intervalos de confiança a 95%, calculados com base no resíduo do termo de interação (acima definido) da ANOVA TRIFACTORIAL (dados transformados por $\ln x$): **a)** Latência da corte para os regimes *short-term*; **b)** Latência da corte para os regimes *long-term*; **c)** Duração da corte para os regimes *short-term*; **d)** Duração da corte para os regimes *long-term*; **e)** Latência do acasalamento para os regimes *short-term*; **f)** Latência do acasalamento para os regimes *long-term*.

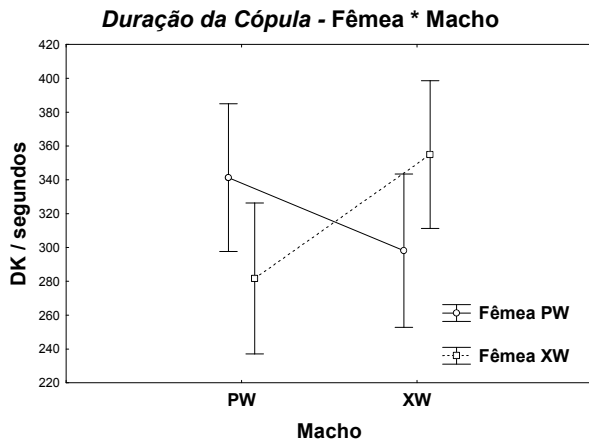


Figura 3.3.1g

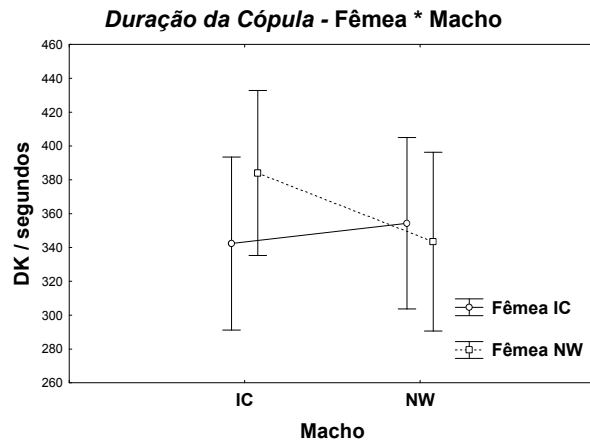


Figura 3.3.1h

Figura 3.3.1 (continuação) – Valores médios dos parâmetros do comportamento de acasalamento. As barras de erro correspondem aos intervalos de confiança a 95%, calculados com base no resíduo do termo de interação (acima definido) da ANOVA TRIFACTORIAL: **g)** Duração da cópula para os regimes *short-term* **h)** Duração da cópula para os regimes *long-term*.

Os testes *t* de *Student* aplicados aos dados da competição não revelaram efeitos significativos da cor do macho ou do tipo de fêmea no desempenho relativo do macho (tabelas 3.3.2 e 3.3.3).

Tabela 3.3.2 – Valores de *t* e *p* do teste *t* de *Student* ao efeito da cor no desempenho do macho para cada tipo de fêmea ($H_0: \mu_{\text{AZUL}} = \mu_{\text{VERMELHO}}$; $H_1: \mu_{\text{AZUL}} \neq \mu_{\text{VERMELHO}}$):
a) Regimes *short-term*; b) Regimes *long-term*.

a)	REGIMES SHORT-TERM	
Tipo ♀	♀ PW	♀ XW
<i>t-value</i>	-0.6637	0.6265
<i>p-value</i>	0.5752	0.5950

b)	REGIMES LONG-TERM	
Tipo ♀	♀ IC	♀ NW
<i>t-value</i>	-0.0491	0.7076
<i>p-value</i>	0.9653	0.5526

Tabela 3.3.3 – Valores de *t* e *p* do teste *t* de *Student* ao efeito do tipo de fêmea no desempenho do macho: a) Regimes *short-term* ($H_0: \mu_{\text{PW}} = \mu_{\text{XW}}$; $H_1: \mu_{\text{PW}} \neq \mu_{\text{XW}}$); b) Regimes *long-term* ($H_0: \mu_{\text{IC}} = \mu_{\text{NW}}$; $H_1: \mu_{\text{IC}} \neq \mu_{\text{NW}}$).

a)	REGIMES SHORT-TERM
<i>t-value</i>	-0.6795
<i>p-value</i>	0.5669

b)	REGIMES LONG-TERM
<i>t-value</i>	-0.1513
<i>p-value</i>	0.8936

Não se verificaram diferenças significativas entre os regimes de efectivo populacional em ambos os tempos de permanência em laboratório (**tabela 3.3.4**), apesar de, em média, os regimes *small-size* terem menor performance relativamente aos *large-size* (**figura 3.3.2**). O teste binomial (calculado com base no número de sucessos no total de tentativas) devolveu resultados semelhantes aos obtidos com o teste *t* em ambos os modelos *short-term* ($p=0.7193$) e *long-term* ($p=0.7338$). As distribuições teóricas (funções massa de probabilidade) e os valores obtidos para cada modelo encontram-se graficamente representados nas **figuras 3.3.3 e 3.3.4**.

Tabela 3.3.4 – Valores de *t* e *p* do teste *t* de Student à igualdade da média a $\arcsen\sqrt{0.5}$: ($H_0: \mu_{\text{REGIME}} = \arcsen\sqrt{0.5}$; $H_1: \mu_{\text{REGIME}} \neq \arcsen\sqrt{0.5}$): **a)** Regimes *short-term*; **b)** Regimes *long-term*.

a)	REGIMES SHORT-TERM	b)	REGIMES LONG-TERM
<i>t-value</i>	-0.3108	<i>t-value</i>	-0.3813
<i>p-value</i>	0.8082	<i>p-value</i>	0.7681

Quando em competição com a respectiva *small-size*, as populações *large-size* não revelaram diferenças significativas entre si; o recíproco também se verificou: não se registaram diferenças entre as populações *small-size* quando em competição com as respectivas *large-size* (**tabela 3.3.5**).

Tabela 3.3.5 – Valores de *t* e *p* do teste *t* de Student à performance relativa das populações: **a)** *Large-size* quando em competição com a respectiva *small-size* ($H_0: \mu_{XW} = \mu_{NW}$; $H_1: \mu_{XW} \neq \mu_{NW}$) e **b)** *Small-size* quando em competição com a respectiva *large-size* ($H_0: \mu_{PW} = \mu_{IC}$; $H_1: \mu_{PW} \neq \mu_{IC}$).

a)	REGIMES LARGE-SIZE	b)	REGIMES SMALL-SIZE
<i>t-value</i>	0.0564	<i>t-value</i>	-0.0564
<i>p-value</i>	0.9602	<i>p-value</i>	0.9602

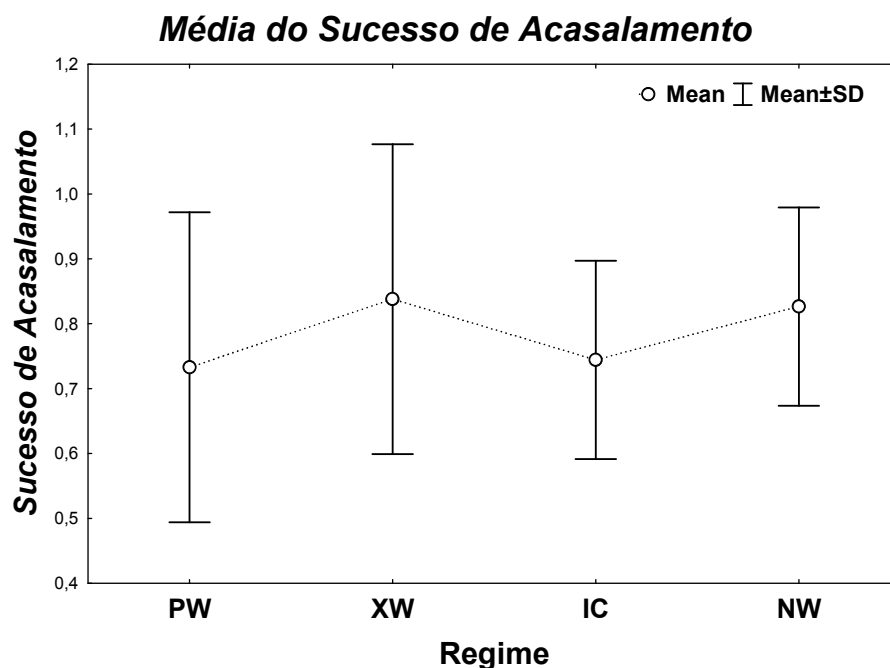


Figura 3.3.2 – Valores médios do sucesso de acasalamento (com transformação angular) para os quatro regimes em estudo. As barras correspondem ao desvio-padrão da média das populações-réplica.

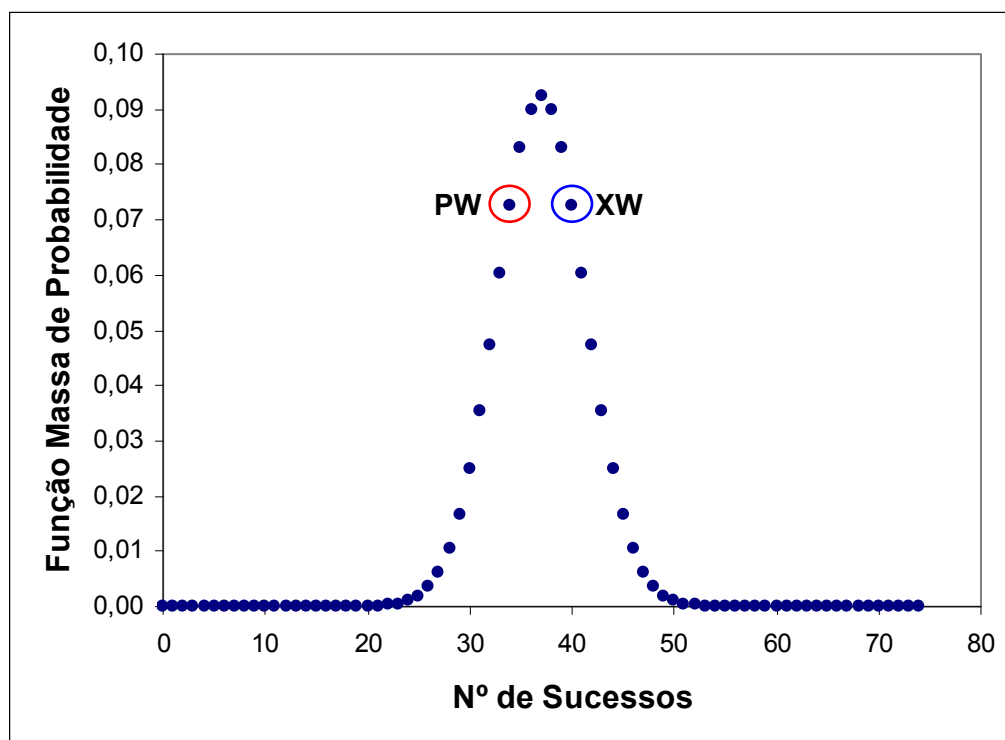


Figura 3.3.3 – Distribuição teórica do sucesso de acasalamento para os regimes *short-term* – $X \cap \text{BINOMIAL}(74, 0.5)$. Os valores observados encontram-se assinalados.

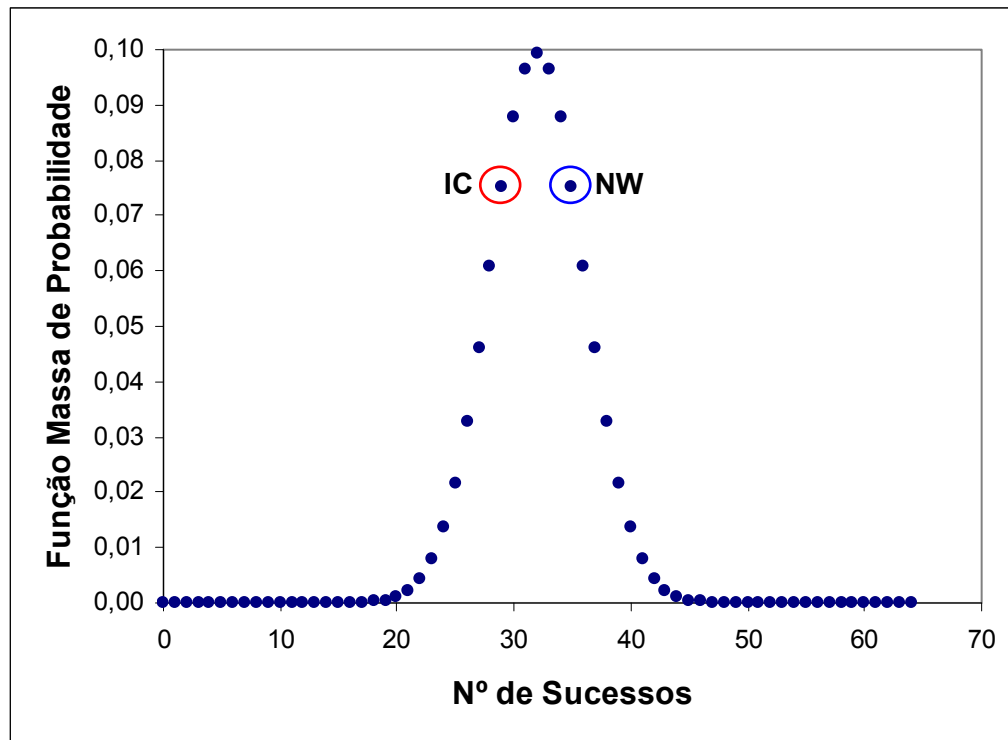


Figura 3.3.4 – Distribuição teórica do sucesso de acasalamento para os regimes *long-term* – $X \cap \text{BINOMIAL}(64, 0.5)$. Os valores observados encontram-se assinalados.

3.4. Discussão

Comportamento de acasalamento – uma questão de rapidez?

Nos parâmetros temporais do comportamento do acasalamento esperar-se-ia, na generalidade, pior desempenho das populações em regime de efectivo reduzido: maior latência e corte mais longa (consequentemente, maior latência de acasalamento) e cópula mais breve. Apesar da análise de variância não mostrar diferenças significativas, as populações *small-size* comportaram-se em geral no sentido esperado, sobretudo nas populações há menos tempo em laboratório (**figura 3.3.1a**), indicando uma potencial influência da consanguinidade no desempenho geral das populações. No entanto, na duração da cópula as diferenças de desempenho de machos dos regimes mais recentemente introduzidos dependeu do tipo de fêmea envolvida no acasalamento, sendo a cópula mais prolongada em casais homogâmicos do que em heterogâmicos.

Quando e durante quanto tempo? – a perspectiva da fêmea

A influência da fêmea no comportamento e desempenho do macho durante o acasalamento faz-se sentir mais fortemente na duração da corte e no sucesso do acasalamento. Quando em situação de não competição, as expectativas são de melhor performance das populações de maior tamanho e tempo de permanência em laboratório. Não obstante a falta de significância estatística, os resultados obtidos mostram uma tendência em conformidade com o teoricamente previsto: uma diminuição da duração da corte nos regimes de efectivo elevado, relativamente aos de efectivo reduzido (em especial nas condições de homogamia). Todavia, não se registaram diferenças entre regimes com tempos de permanência em laboratório distintos devido, provavelmente, ao delineamento deste conjunto de experiências.

Quem? – machos em competição pelo acasalamento

O sucesso de acasalamento de machos em competição e a sua relação com a consanguinidade é uma temática que tem vindo a ser abordada há várias décadas. A concepção generalizada é de que machos consanguíneos têm pior performance do que os não-consanguíneos (Joshi, 2005), que o baixo sucesso de acasalamento dos machos *inbred* se deve principalmente a uma reduzida capacidade atlética (Maynard Smith, 1956) e à menor variabilidade das feromonas por eles produzidas (Averhoff & Richardson, 1974, 1976).

Os dados obtidos nesta parte do projecto corroboram as expectativas teóricas de menor performance das populações em regime de efectivo reduzido quando em competição com as de efectivo elevado, não se verificando, porém, diferenças estatisticamente significativas entre os dois regimes. Nenhuma consideração se pode tecer relativamente à escolha pela fêmea de um macho em detrimento de outro, talvez pela baixa replicação envolvida nestes ensaios.

Ainda que a sua complexidade o torne difícil de quantificar, a contribuição do comportamento de acasalamento na *fitness* das populações salienta a importância deste tipo de experiências. Continuam pouco claras as implicações da consanguinidade no comportamento de acasalamento, não havendo muitos estudos que abordem esta problemática. Apesar do baixo poder estatístico do delineamento (devido essencialmente a constrangimentos de material biológico), este trabalho funcionou como base exploratória para outros e melhores estudos de comportamento em *Drosophila subobscura*.

Considerações Finais

Adaptação ao laboratório – confirma-se o padrão observado anteriormente

O laboratório pode assumir-se como apenas mais um ambiente da história evolutiva de uma população, donde se espera um padrão geral de adaptação (Matos *et al.*, 2000). Os resultados apresentados nesta dissertação vêm corroborar os obtidos anteriormente em estudos de adaptação ao laboratório: as populações com maior tempo de permanência neste ambiente mostraram uma tendência geral para melhor desempenho em várias características da história da vida (em especial, nas associadas à fecundidade), maior *fitness* e menor taxa evolutiva do que as populações mais recentemente introduzidas (Gilligan & Frankham, 2003; Matos *et al.*, 2002, 2004; Simões *et al.*, 2007, 2008a).

Estocasticidade da deriva genética causa divergência entre populações

A deriva genética é um processo evolutivo estocástico que altera as frequências alélicas de uma determinada população, numa dada geração. A sua acção pode levar à divergência entre populações sujeitas ao mesmo regime selectivo, contrariando o efeito da selecção natural (Hartl & Clark, 1989; Frankham *et al.*, 2002). Espera-se que o seu efeito seja tão mais severo quando menor for o tamanho da população. Neste projecto observou-se de forma consistente um aumento da heterogeneidade entre populações-réplica nos regimes de efectivo reduzido relativamente aos de efectivo elevado.

Efectivo populacional – desempenho e resposta

De acordo com as expectativas teóricas, quanto menor for o efectivo de uma população, maior será a sua consanguinidade e mais severa a perda de variabilidade por deriva genética; é, então, esperada uma menor *fitness*, menor potencial evolutivo e menor resposta à selecção (Woodworth *et al.*, 2002). Os dados obtidos neste trabalho sugerem, na generalidade, uma diminuição no desempenho das populações de efectivo reduzido nas características associadas à *fitness* (como a fecundidade e o comportamento de acasalamento) e um abrandamento na dinâmica evolutiva. Os resultados relativos à resposta evolutiva não corresponderam exactamente ao previsto pelos modelos teóricos (*e.g.* Frankham & Kingslover, 2004). Esta circunstância poderá estar relacionada com o facto das características relevantes para a *fitness*

(como a fecundidade) possuírem níveis elevados de variância genética não-aditiva (dominância e epistasia): esta, ao ser canalizada para variância genética aditiva ao longo das gerações, pode estabilizar a matriz de variâncias e covariâncias (Falconer & Mackay, 1996; Frankham *et al.*, 2002).

Depressão consanguínea e Conservação

A diversidade biológica está, actualmente, a sofrer diminuições violentas devidas à acção antropogénica – *Sexta Extinção*. Os factores genéticos são preponderantes nas extinções biológicas, na medida em que as espécies ameaçadas apresentam geralmente populações pequenas, onde a consanguinidade e a perda de variabilidade genética são inevitáveis. Muitas espécies têm como última alternativa à extinção a reprodução em programas de conservação *ex-situ*, que visam a gestão e manutenção da variabilidade das populações em cativeiro para uma futura reintrodução no ambiente natural (Frankham *et al.*, 2002; Frankham, 2005a).

Uma das estratégias proposta como modelo de gestão em cativeiro é a fragmentação de populações de espécies ameaçadas em subpopulações panmícticas de menor efectivo com troca esporádica de material genético (Margan *et al.*, 1998; Woodworth *et al.*, 2002; Frankham, 2005b, 2008). Com esta abordagem espera-se que a perda de variabilidade por deriva genética ocorra essencialmente nas subpopulações, sendo mantida ao nível da metapopulação. As expectativas apontam para o aumento da frequência de indivíduos heterozigóticos, a diminuição da consanguinidade e, por conseguinte, uma redução na depressão consanguínea, traduzida num aumento da *fitness* da descendência híbrida resultante (Frankham *et al.*, 2002). Os dados obtidos neste trabalho resultaram no sentido esperado, tendo os híbridos das populações-réplica demonstrado uma *fitness* ligeiramente superior à das populações parentais.

A análise do efeito do efectivo populacional na dinâmica evolutiva é uma abordagem fundamental em estudos evolutivos, em geral e na problemática da conservação, em particular. Apesar dos estudos já realizados, são necessários outros, mais extensos, com maior replicação e abrangência de gerações, para melhor clarificar o efeito da consanguinidade e da interacção deriva genética-selecção natural na adaptação das populações a novos ambientes.

Bibliografia

- Averhoff, W. & Richardson, H.** (1974) *Pheromonal control of mating patterns in *Drosophila melanogaster**. Behav. Genet. **4**: 207-225
- Averhoff, W. & Richardson, H.** (1976) *Multiple pheromone system controlling mating in *Drosophila melanogaster**. Proc. Nat. Acad. Sci. USA **73**: 591-593
- Brown, M. B. & Forsythe, A. B.** (1974) *Robust tests for the equality of variances*. J. Am. Stat. Ass. **69**: 364-167
- Chippindale, A. K., Ngo, A. L. & Rose, M. R.** (2004) *The devil in the details of life-history evolution: instability and reversal of genetic correlations during selection on *Drosophila* development*. Journal of Genetics **82**: 133-145
- Crnokrak, P. & Roff, D. A.** (1995) *Dominance variance: associations with selection and fitness*. Heredity **75**: 530-540
- Darwin, C. R.** (1868) *The variation of animals and plants under domestication – Vol.1*. 1st Ed. John Murray, London
- Darwin, C. R.** (1876) *On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life*. 6th Ed. John Murray, London
- Diamond, J. & Bellwood, P.** (2003) *Farmers and Their Languages: The First Expansions*. Science **300**: 597-603
- Dunbar, R. I. M.** (1982) *Adaptation, fitness and the evolutionary tautology*. In: *Current Problems in Sociobiology* (Eds. King's College Sociobiology Group), Cambridge University, Cambridge Press
- Dyer, A. R.** (1974) *Comparisons of Tests for Normality with a Cautionary Note*. Biometrika **61**: 185-189
- Edwards, A. C., Rollmann, S. M., Morgan, T. J. & Mackay, T.** (2006) *Quantitative genomics of aggressive behavior in *Drosophila melanogaster**. PLoS Genet **2**(9): e154. DOI: 10.1371/journal.pgen.0020154
- Eldredge, N.** (2001) *The Sixth Extinction*. Actionbioscience website article: <http://www.actionbioscience.org/newfrontiers/eldredge2.htm>
- Falconer, D. S. & Mackay, T. F. C.** (1996) *Introduction to Quantitative Genetics*. 4th Ed. Longman, Harlow, Essex
- Fisher, R. A.** (1930) *The Genetical Theory of Natural Selection*. Clarendon Press, Oxford
- Frankham, R.** (1995) *Conservation genetics*. Annu. Rev. Genet. **29**: 305-327

- Frankham, R.**, Manning, H., Margan, S. H., Briscoe, D.A. (2000) *Does equalisation of family sizes reduce genetic adaptation to captivity?* *Animal Conservation* **3**: 357-363
- Frankham, R.**, Ballou, J. D. & Briscoe, D. A. (2002) *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge
- Frankham, R.** & Kingslover, J. G. (2004) *Response to environmental change: adaptation or extinction*. In: *Evolutionary Conservation Biology*. Cambridge University Press, Cambridge
- Frankham, R.** (2005a) *Genetics and extinction*. *Biological Conservation* **126**: 131-140
- Frankham, R.** (2005b) *Stress and adaptation in conservation genetics*. *J. Ev. Biol.* **18**: 750-755
- Frankham, R.** (2008) *Genetic adaptation to captivity in species conservation programs*. *Mol. Ecol.* **17**: 325-333
- Franklin, I. R.** (1980) *Evolutionary change in small populations*. In: Soulé, M. E., Wilcox, B. A. (Eds.), *Conservation Biology: an Evolutionary–Ecological Perspective*. Sinauer, Sund.
- Friberg, U.** & Arnqvist, G. (2003) *Fitness effects of female mate choice: preferred males are detrimental for *Drosophila melanogaster* females*. *J. Evol. Biol.* **16**: 797-811
- Futuyma, D. J.** (1998) *Evolutionary Biology*. 3rd Ed. Sinauer Associates, Sunderland
- Gavrilets, S.**, Arnqvist, G. & Friberg, U. (2001) *The evolution of female mate choice by sexual conflict*. *Proc. R. Soc. Lond. B* **268**: 531-539
- Gilligan, D.** & Frankham, R. (2003) *Dynamics of genetic adaptation to captivity*. *Conservation Genetics* **4**: 189-197
- Gilligan, D. M.**, Briscoe, D. A. & Frankham, R. (2005) *Comparative losses of quantitative and molecular genetic variation in finite populations of *Drosophila melanogaster**. *Gen. Res.* **85**: 47-55
- Grant, B.** & Mettler L. E. (1969) *Disruptive and Stabilizing Selection on the “Escape” Behavior in *Drosophila melanogaster**. *Genetics* **62**: 625-637
- Grubbs, F. E.** (1969) *Procedures for Detecting Outlying Observations in Samples*. *Technometrics*. **11**: 1-21
- Hartl, D. L.** & Clark, A. G. (1989) *Principles of Population Genetics*. 2nd Ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland
- Holland, B.** & Rice, W. (1998) *Perspective: Chase-away sexual selection: antagonistic seduction versus resistance*. *Evolution* **52**: 1-7
- Holland, B.** & Rice, W. (1999) *Experimental removal of sexual selection reverses intersexual antagonistic coevolution and removes a reproductive load*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 5083-5088

- Huey, R. B.,** Hertz, P. E. & Sinervo, B. (2003) *Behavioral Drive versus Behavioral Inertia in Evolution: A Null Model Approach*. Am. Nat. **161**: 357-366
- Joshi, A.** (2005) *Inbreeding and sex: canalization, plasticity and sexual selection*. Journal of Genetics **84**: 13-15
- Latter, B. D. & Mulley J. C.** (1995) *Genetic adaptation to captivity and inbreeding depression in small laboratory populations of *Drosophila melanogaster**. Genetics **139**: 255-266
- Lewontin, R. C.** (1974). *The genetic basis of evolutionary change*. Columbia University Press, New York
- Lynch, M. & Walsh, J. B.** (1998) *Genetics and Analysis of Quantitative Traits*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland
- Mackay, T.,** Heinsohn, S., Lyman, R., Moehring, A., Morgan, T. & Rollmann, S. (2005) *Genetics and Genomics of *Drosophila* Mating Behaviour*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **102**: 6622-6629
- Margan, S.,** Nurthen, R., Montgomery, M., Woodworth, L., Lowe, E., Briscoe, D. & Frankham, R. (1998) *Single large or several small? Population fragmentation in the captive management of endangered species*. Zoo Biology **17**: 467-480
- Matos, M.,** Rose, M. R., Rocha Pit , M. T., Rego, C. & Avelar, T. (2000) *Adaptation to the laboratory environment in *Drosophila subobscura**. J. Evol. Biol. **13**: 9-19
- Matos, M.,** Avelar, T. & Rose, M. R. (2002) *Variation in the rate of convergent evolution: adaptation to a laboratory environment in *Drosophila subobscura**. J. Evol. Biol. **15**: 673-682
- Matos, M.,** Simões, P., Duarte, A., Rego, C., Avelar, T. & Rose, M. R. (2004) *Convergence to a novel environment: comparative method versus experimental evolution*. Evolution **58**: 1503-1510
- Maynard Smith, J.** (1956) *Fertility, mating and sexual selection in *Drosophila subobscura**. Journal of Genetics **54**: 261-279
- Michod, R. E.** (2000) *Darwinian Dynamics: Evolutionary Transitions in Fitness and Individuality*. Princeton University Press, Princeton
- Mignon-Grasteau, S.,** Boissy, A., Bouix, J. Faure, J. M., Fisher, A. D., Hinch, G. N., Jensen, P., Neindre, P., Morm de, P., Prunet, P., Vandeputte, M. & Beaumont, C. (2005) *Genetics of adaptation and domestication in livestock*. Livestock Production Science **93**: 3-14
- Moehring, A. & Mackay, T.** (2004) *The Quantitative Genetic Basis of Male Mating Behavior in *Drosophila melanogaster**. Genetics **167**: 1249-1263

- Mueller, L. D.**, Folk, D. G., Nguyen, N., Nguyen, P., Lam, P., Rose, M. R. & Bradley, T. (2005) *Evolution of larval foraging behaviour in Drosophila and its effects on growth and metabolic rates*. *Physiological Entomology* **30**: 262-269
- Olejnik, S. F.** & Algina, J. (1987) *Type I Error Rates and Power Estimates of Selected Parametric and Nonparametric Tests of Scale*. *J. Educ. Behav. Stat.* **12**: 45-61
- Raup, D. M.** & Sepkoski Jr., J. J. (1982) *Mass extinctions in the marine fossil record*. *Science* **215**: 1501-1503
- Reed, D. H.** & Frankham, R. (2001) *How closely correlated are molecular and quantitative measures of genetic variation? A meta-analysis*. *Evolution* **55**: 1095-1103
- Reed, D. H.**, Lowe, E. H., Briscoe, D. A. & Frankham, R. (2003) *Fitness and adaptation in a novel environment: effect of inbreeding, prior environment and lineage*. *Evolution* **57**: 1822-1828
- Robertson, A.** (1952) *The effect of inbreeding on the variation due to recessive genes*. *Genetics* **37**: 189-207
- Robertson, A.** (1960) *A theory of limits in artificial selection*. *Proc. Roy. Soc. London B* **153**: 234-249
- Rodríguez-Ramilo, S. T.**, Morán, P. & Caballero, A. (2006) *Relaxation of Selection With Equalization of Parental Contributions in Conservation Programs: An Experimental Test With Drosophila melanogaster*. *Genetics* **172**: 1043-1054
- Rodríguez-Trelles, F.**, Rodríguez, M., Scheiner, S. (1998) *Tracking the Genetic Effects of Global Warming: Drosophila and Other Model Systems*. *Ecology and Society* **2**: 2.
Disponível em: <http://www.consecol.org/vol2/iss2/art2/>
- Rose, M. R.**, Nusbaum, T. J. & Chippindale, A. K. (1996) *Laboratory Evolution: the experimental wonderland and the Cheshire cat syndrome*. In: Rose, M. R. & Lauder, G.V. (Eds.) *Adaptation*. Academic Press, San Diego
- Service P. M.** & Rose, M. R. (1985) *Genetic Covariation Among Life-History Components – The Effect of Novel Environments*. *Evolution* **39**: 943-945
- Service, P. M.** (1993) *Laboratory evolution of longevity and reproductive fitness components in male fruit flies: mating ability*. *Evolution* **47**: 387-399
- Sgrò, C. M.** & Partridge, L. (2000) *Evolutionary responses of the life history of wildcaught Drosophila melanogaster to two standard methods of laboratory culture*. *Am. Nat.* **156**: 341-353
- Sharp, P.** (1984) *The effect of inbreeding on competitive male-mating ability in Drosophila melanogaster*. *Genetics* **106**: 601-612

- Simões, P.**, Rose, M. R., Duarte, A., Gonçalves, R. & Matos, M. (2007) *Evolutionary domestication in Drosophila subobscura*. J. Evol. Biol. **20**: 758-766
- Simões, P.**, Santos, J., Fragata, I., Mueller, L. D., Rose, M. R. & Matos, M. (2008a) *How repeatable is adaptive evolution? The role of geographical origin and founder effects in laboratory adaptation*. Evolution **62**: 1817-1829
- Simões, P.**, Pascual, M., Santos, J., Rose, M. R. & Matos, M. (2008b) *Evolutionary dynamics of molecular markers during local adaptation: a case study in Drosophila subobscura*. BMC Evolutionary Biology **8**: 66
- Simões, P.**, Santos, J. & Matos, M. (2009) *Experimental domestication*. In: *Experimental Evolution: Concepts, Methods, and Applications* (Eds. Garland, T. & Rose, M. R.). California University Press (em impressão)
- Singh, S. R.** & Singh, B. N. (2003) *Behavioral genetics of Drosophila ananassae*. Genet. Mol. Res. **2**: 394-409
- Sokal, R. R.** & Rohlf, F. J. (1995) *Biometry 3rd Ed.* W. H. Freeman and Company. New York
- Sokolowski, M. B.**, Pereira, H. S. & Hughes, K. (1997) *Evolution of foraging behavior in Drosophila by density-dependent selection*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**: 7373-7377
- Speth, H.** (1952) *Mating behavior within the genus Drosophila (Diptera)*. Bulletin of The American Museum of Natural History. Vol. **99**: Article 7. New York
- Speth, H.** & Ringo, J. (1983) *Mating behaviour and sexual isolation in Drosophila*. In: Ashburner M., Carson H., Thompson J. *The genetics and biology of Drosophila.*, Vol. 3c. Academic Press, London
- Steele, R. H.** (1986a) *Courtship feeding in Drosophila subobscura. I. The nutritional significance of courtship feeding*. Anim. Behav. **34**: 1087-1098
- Steele, R. H.** (1986b) *Courtship feeding in Drosophila subobscura. II. Courtship feeding by males influences female mate choice*. Anim. Behav. **34**: 1099-1108
- Teotónio, H.** & Rose, M. R. (2000) *Variation in the reversibility of evolution*. Nature **408**: 463-466
- Teotónio, H.**, Matos, M. & Rose, M. R. (2002) *Reverse evolution of fitness in Drosophila melanogaster*. J. Evol. Biol. **15**: 608-617
- Woodworth, L.**, Montgomery, M., Briscoe, D. & Frankham, R. (2002) *Rapid genetic deterioration in captive populations: Causes and conservation implications*. Conservation Genetics **3**: 277-288